

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) **FEDERAL REPUBLIC  
OF GERMANY**  
[SEAL]  
**GERMAN  
PATENT AND  
TRADEMARK OFFICE**

(12) **Offenlegungsschrift (Unexamined)**  
(10) **DE 101 60 975 A 1**

(21) Reference: 101 60 975.2  
(22) Filing date: Dec. 10, 2001  
(43) Date laid open: June 18, 2003

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:  
**B 01 L 3/00**  
A 61 M 1/14  
B 01 D 61/24  
G 01 N 33/48  
C 12 M 3/00

<p>(71) Applicant: Friedrich Schiller University Jena, 07743 Jena, DE</p> <p>(72) Inventors: Horn, Anton, Prof. Dr., 07749 Jena, DE; Kreusch, Stefan, Dr., 07751 Bucha, DE; Sammler, Günther, 07749 Jena, DE; Bublitz, Renate, Dr., 07743 Jena, DE; Schwedter, Sina, 99817 Eisenach, DE</p>	<p>(56) Documents taken into consideration for determining the patentability:</p> <p>DE 197 12 484 C2 DE 2,733,214 A1 DE 9,409,089 U1 GB 2,188,418 A US 6,083,761 US 5,801,055 US 5,650,323 US 5,587,321 US 5,417,923 US 5,326,533 US 4,948,564 US 4,673,651 US 4,450,076 US 555,456 EP 0,408,940 A1 EP 0,131,934 A2</p>
---	--

**The following information is taken from the documents submitted by the applicant**

(54) Sample plate for use in dialysis systems

(57) The problem was to dialyze simultaneously a plurality of microsamples in the  $\mu\text{L}$  range in a manner that is essentially uniform, easily handled, and of as low expenditure as possible, whereby this dialysis is to be carried out under the requirements of modern screening and analysis methods with high sample throughput in a rapid and, if need be, in a manner that can be automated.

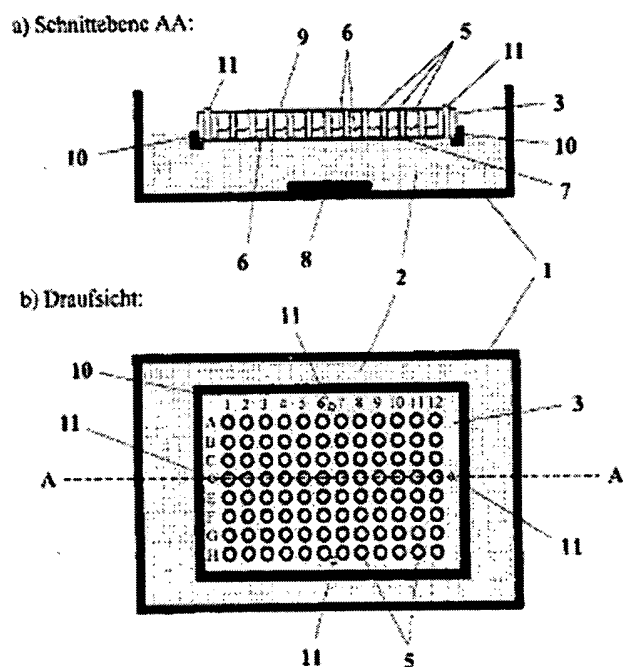
The dialysis should also permit a sufficiently high recovery of small volumes for secondary procedures when the sample throughput is high.

In accordance with the invention, the sample plate (3) contains a plurality of

identical sample containers (5), which are arranged in a grid ( $n \times 8 \times 12$ ) that is in itself known and which are suitable for the liquid handling technique of microplate technology, the top ends of which are open and the bottom ends of which are closed by membranes (7) lying in a plane. In the grid region of the sample containers (5), the sample plate (3) does not have any regions or elements that protrude beyond the plane of the membranes (7) and that form or promote gas barriers in the dialysis liquid (2) during proper use.

In the edge region, the sample plate (3) has elements allowing the escape of air after immersion in the dialysis liquid.

The invention can find application in a diverse variety of dialysis systems, including those in which, for analytical purposes, especially a large number of microbes<sup>1</sup> must be separated from their low molecular weight constituents that interfere with the analysis.



a) Sectional plane AA:

b) Plan view:

<sup>1</sup> [sic] [Translator's Note: Probably a misprint for "microsamples".]

### Description

**[0001]** The invention concerns a sample plate with sample containers for receiving liquids for a dialysis separation by way of at least one semipermeable membrane and a dialysis liquid. Such a sample plate can find application anywhere where, for analytical purposes, especially a large number of microsamples, whose macromolecular components are to be investigated and must be separated from their low molecular weight constituents that interfere with the analysis in a manner that is of as low expenditure, as efficient, and as easily handled as possible. Moreover, it is employed advantageously to concentrate macromolecule-containing microsamples rapidly, gently, and without great losses. A further field of application is the rebuffering of samples, particularly in the field of DNA processing, for the investigation of proteins and for sequentially occurring enzymatic reactions.

**[0002]** In recent years, highly parallel screening procedures (high throughput screening = HTS and ultra high throughput screening = UHTS) with extremely high analysis frequencies have found entry into analysis, this being triggered particularly by the efforts of the pharmaceutical industry to obtain “targets” for the development of new pharmaceuticals. Proteome analysis, which is developing exceptionally rapidly at present, also requires very high sample throughputs for the characterization of the plurality of proteins of a proteome with the biological modifications thereof, as well as for various states, such as, for example, healthy and diseased states. In addition, for many fields of application in biochemical and biotechnological research, high throughput analysis – for example, for the characterization of enzymes by way of their activity, for the characterization of analytical and preparative chromatographic separations, for large-scale renaturation of protein samples, and for the characterization of nucleic acids – is becoming an indispensable tool.

**[0003]** These high throughput procedures have led to the development of special analytical procedures and, in ancillary fields, to adaptable auxiliary techniques, which are

grouped around the microtiter plate grid of  $8 \times 12$  analysis positions per base area of the plate of approximately  $12.6 \text{ cm} \times 8.5 \text{ cm}$ . To be observed at present is a trend toward further compaction of the analysis positions on the same base area of  $n \times 8 \times 12$  for  $n = 4$ ,  $n = 16$ , and even more densely occupied analysis plates.

**[0004]** It is very common for macromolecular substances, such as DNA and fragments thereof, proteins, and peptides, glycoproteins, and synthetic macromolecules as well as combinations of the substances listed, to be of interest.

**[0005]** Two additional new analytical procedures, MALDI-MS = matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry and ESI-MS = electrospray ionization mass spectrometry were developed only a few years ago and have proven to be indispensable procedures for HTS/ UHTS and for proteome analysis, particularly in combination here with protease digestion methods. All in all, a strong trend toward miniaturization of the analytical procedures is evident. Many of the procedures used for high throughput screening require a special preliminary sample preparation with high requirements. Such requirements are:

1. The samples should have only a low salt or detergent concentration or they must be present in a defined ionic milieu.
2. The samples, which are present in the  $\mu\text{L}$  volume range, must be handled in a highly parallel manner in order to guarantee the requisite frequency of analysis. The treatment must take place for all samples under standardized conditions in a uniform manner.
3. The recovery must be sufficiently high for these microsamples in the process of sample preparation.
4. Samples from biological material often must be gently concentrated prior to the analysis in order to attain the requisite target concentration.

**[0006]** In order to remove low molecular weight substances, to transfer samples into a defined milieu, and to concentrate macromolecular substances, the dialysis procedure using semipermeable membranes has proven useful. Thus, there are a large number of suppliers of dialysis procedures, which, for example, are compiled in the Internet under the address <http://biosupplynet.com>.

**[0007]** The main efforts of companies and inventors to improve the dialysis technique are directed in essence at overcoming problems in the practical handling of the technique, such as, for example, mixing problems, recovery problems for macromolecules, problems with the speed of the dialysis process, and problems that arise in connection with small volumes ( $\mu\text{L}$  range).

**[0008]** For MALDI and ESI-MS procedures, mostly a removal of salts, detergents, and other contaminating substances is necessary according to the known prior art.

**[0009]** Possibilities to improve in itself the quality of the essential mixing of a dialysis solution are described in US 5,183,564 and in US 6,176,609. The latter document refers to a general procedure for mixing in a number of containers. In order to take into account the general trend toward miniaturization, a number of solutions have been proposed. Mentioned in US 6,039,871 are thus apparatuses that are intended as disposable materials and that provide for the dialysis of 10 - 100  $\mu\text{L}$  samples in special containers that stick together. Presented in US 5,733,442 is a closed microdialysis system with microchambers that can screw together and that have two dialysis membranes and a special stirring device.

**[0010]** The problem of recovery of small analysis volumes is addressed by the introduction of a special collecting chamber in US 6,217,772. In the documents US 5,783,075 and US 5,503,741, a proposal for floating dialysis in specially configured vessels is put forward. For floating dialysis, there are also products of the PGC companies, the Daigger company, and the Pierce company with the widespread slide dialysis system.

**[0011]** In order to increase the speed of dialysis taking into special consideration the ESI-MS technique, a capillary dialysis system is proposed in US 5,954,959. For the dialysis of a plurality of samples, there are proposals in US 4,450,076, in which the dialysis containers are arranged around a central axis and are moved by rotation. Products from PGC scientific also provide for equilibrium dialysis chambers arranged around a central axis, these chambers being sealed with Teflon-coated screws. Offered by Pierce is a microdialysis system for  $12 \times 20 - 100 \mu\text{L}$  volumes.

**[0012]** However, the proposed solutions are not suitable for the requirements of high throughputs, such as those required for HTS, UHTS and for proteome analysis, because they are either

1. not adaptably designed for the highly parallel microplate technology, particularly for the corresponding liquid handling technique;
2. do not permit a dialysis of large sample numbers in the  $\mu\text{L}$  volume range that takes place simultaneously and in a manner that is essentially uniform for all samples;
3. do not permit adequately high recovery of these small volumes for secondary analytical procedures;
4. do not provide for a suitably high speed of dialysis;
5. necessitate impracticably high volumes of the dialysis liquid; or
6. are impractical in routine operation with a high throughput owing to their complicated method of use.

**[0013]** The invention is based on the problem of dialyzing simultaneously a plurality of microsamples in the  $\mu\text{L}$  range in a manner that is essentially uniform, easily handled, and of as low expenditure as possible, whereby this dialysis is to be carried out under the requirements of

modern screening and analysis methods with high sample throughput in a rapid and, if need be, manner that can be automated.

**[0014]** The dialysis should also permit an adequately high recovery of small volumes for secondary analytical procedures when the sample throughput is high.

**[0015]** In accordance with the invention, the sample plate employed for this purpose contains a plurality of identical sample containers, which are arranged in a grid ( $n \times 8 \times 12$ ) that is in itself known, and which are suitable for the liquid handling technique of microplate technology, the top ends of which are open and the bottom ends of which are closed by dialysis membranes lying in a plane. In the grid region of the sample containers, the sample plate does not have any regions or elements that protrude beyond (lie below) the plane of the dialysis membranes and that, when the sample plate is used, are immersed in the dialysis liquid, from which the sample containers of the sample plate are separated by the dialysis membranes, and there form or promote air barriers that impede the dialysis. If, however, gases due to the process enter into the zone of contact between dialysis liquid and sample plate, these can escape through ventilation elements in order to ensure, in any case, a complete contact between dialysis liquid and sample plate without gas barriers, such as air bubbles, etc. This interference-free contact is the prerequisite for a dialysis of these large sample numbers that takes place simultaneously and in a manner that is essentially uniform for all samples, especially in the  $\mu\text{L}$  range.

**[0016]** With these advantageous features for a proper utilization, the sample plate can be used universally in diversely designed, manually or automatically operated dialysis systems that are assigned a diverse variety of tasks, independently of whether the sample plate rests in a fixed position in a dialysis vessel or is arranged in a floating manner in the dialysis liquid present in the vessel.



**[0017]** In the simplest case, the sample plate can consist of a plate with cylindrical wells as sample containers with a capacity for microliter volumes. On the bottom side of the sample plate, the holes (sample containers) are each closed either by a common dialysis membrane or by individual dialysis membranes, which, for example, are fixed adhesively, welded, bonded, or sprayed to the bottom side of the plate. The dialysis membranes can also consist of several layers.

**[0018]** A cover or an adhesive film, as a detachable closure for the upper ends of the sample containers, protects the sample material present in the sample containers and prevents an evaporation and a contamination of the small sample quantities in the microliter range. It is advantageous for its proper utilization when the sample plate is situated in a dialysis vessel that has at least one inlet and at least one outlet for the dialysis liquid and thus makes possible a continuous removal of the substances to be dialyzed from the dialysis liquid. The dialysis vessel can in this way be a component part of a circulating system, in which the sample plate in accordance with the invention contacts the dialysis liquid. In this circulating system – for example, in a circulation device controlled by a pump – there can be arranged ion exchangers or detergent-binding adsorbers that keep the concentration of the substances to be removed from the sample very small in the dialysis liquid and thereby increase the speed of the dialysis process as well as minimize the required volume of the dialysis liquid. Also possible is the use of bound complex-forming substances in order, for example, to remove metal ions. The sample plate in this process can be supported in the dialysis vessel – for example, through stand-like or foot-like support elements – or it is arranged in the dialysis liquid of the dialysis vessel via floating elements.

**[0019]** In order to increase the effectiveness of the dialysis still further, it is also advantageous (since many dialyses – for example, of micelle-forming detergents – are only made possible at all in this way) when, in such a dialysis system, not only the dialysis liquid, but also

the sample plate is put in motion for uniform mixing together of the liquids contained in the sample containers – for example, by means of a shaking device.

[0020] The invention will be explained in greater detail below on the basis of the embodiment examples represented in the drawing.

[0021] Shown therein are the following:

[0022] **Fig. 1:** A sample plate supported at the bottom of a dialysis vessel by feet;

[0023] **Fig. 2:** Device with floating support of the sample plate on the surface of the dialysis liquid;

[0024] **Fig. 3:** Dialysis vessel with support of the sample plate in accordance with **Fig. 1** as well as with an inlet and an outlet for the dialysis liquid;

[0025] **Fig. 4:** Dialysis vessel with sample plate in a circulating system for the removal of interfering substances from the dialysis liquid;

[0026] **Fig. 5:** Device for dialysis, in which the sample plate is mounted in a shaker for moving the plate;

[0027] **Fig. 6:** Floating support of the sample plate (compare **Fig. 2**) with conical sample containers;

[0028] **Fig. 7:** Method run for transferring the dialyzed sample material by means of centrifugation from the sample plate with conical sample containers into a collecting plate with cylindrical sample containers;

[0029] **Fig. 8:** Method run in accordance with **Fig. 7** with a seal between sample plate and collecting plate;

[0030] **Fig. 9:** Dependence of the conductivity of the dialysis liquid on the dialysis time.

[0031] Shown in **Fig. 1** is a dialysis vessel **1** containing a dialysis liquid **2** situated therein, on the bottom of which rests, in the interior of the vessel, a sample plate **3** by means of supports **4**. The sample plate **3** consists of a plate-shaped body with an  $8 \times 12$  grid that is in itself known and is adaptable for the liquid handling technique for microplate technology and that

consists of cylindrically arranged wells **5** for receiving sample material **6** in the range of microliter volumes.

**[0032]** On the bottom side of the sample plate **3** is situated a semipermeable dialysis membrane **7** that is fixed adhesively to the plate and is common to all sample containers and by means of which the sample material **6** contained in the wells **5** is in contact, in each case, with the dialysis liquid **2**. For this purpose, the sample plate **3** rests on the supports **4** in such a way that it is immersed, together with the dialysis membrane **7**, in the dialysis liquid **2**. The exchange of small molecules, depending on the exclusion limit, is possible via the dialysis membrane **7** owing to the fact that a compensation of concentration between the dialysis liquid **2** and the liquids of the sample material **6** occurs. The removal of the said small molecules from the sample material **6** thus takes place through the establishment of an equilibrium between the concentrations of the two compartments. Large molecules are held back by the dialysis membrane **7**.

**[0033]** The plane of the dialysis membrane **7** virtually embodies as well the bottommost plane of the sample plate **3** when the latter is properly used. In this grid region of the sample containers (wells **5**), there do not exist any zones or elements for the stabilization, strengthening, handling, etc., or other regions due to manufacture that, from the sample plate **3**, protrude beyond the plane of the dialysis membrane **7**, contact the dialysis liquid **2**, or are immersed in the latter or else are able to form or promote air barriers that interfere with the uniform procedure of the dialysis process.

**[0034]** By means of a magnetic stirrer **8**, which is in itself known, on the bottom of the dialysis vessel **1**, the dialysis liquid **2** is kept in motion in order to maintain a concentration gradient at the dialysis membrane **7** that is as small as possible and to accelerate the dialysis. An adhesive film **9**, as a detachable closure of the top ends of the sample containers (wells **5**), protects the sample material **6** situated in these and prevents an evaporation and a contamination of the small sample volumes.

[0035] Shown in **Fig. 2** is a design that is similar to the embodiment example according to **Fig. 1**, with the difference that the sample plate **3** does not rest in place (as in **Fig. 1**) on the bottom of the dialysis vessel **1** by way of foot-like or stand-like support elements **4**, but rather is supported by way of a frame-shaped floating element **10** directly on the surface of the dialysis liquid **2**, so that the dialysis membrane **7** lies on this surface. This holder is independent of the level of the dialysis liquid **2** in the dialysis vessel **1**. In addition, the sample plate **3** has ventilation holes **11**, which allow the gases that have collected beneath the sample plate **3** to escape and thus ensure a complete contact of the dialysis membrane **7** with the surface of the dialysis liquid **2**. This complete contact creates the prerequisite for a dialysis of these large sample numbers in the  $\mu\text{L}$  range that takes place simultaneously and in a manner that is essentially uniform for all samples. The fact that the sample plate **3** does not have any elements (for example, for support or the like), at least in the grid region of the sample containers (wells **5**), that protrude downward over the plane of the dialysis membrane **7** and are immersed in the dialysis liquid **2** or are able to contact the latter already establishes essential use properties for the proper utilization of the sample plate **3** in a dialysis system in order to prevent or at least not to promote air barriers in the zone of contact of the dialysis liquid **2** at the sample plate **3**. If, nonetheless, gases due to the process arise in this zone of contact, these can, as stated, escape through the ventilation holes **11** upward through the sample plate **3**. In place of the ventilation holes **11**, other elements, such as beveled edges or the like would also be conceivable. For reasons of clarity, the ventilation holes **11** (or other ventilation elements) are not represented explicitly in each design figure of the drawing.

[0036] **Fig. 3** shows an apparatus for dialysis in which the sample plate **3** (as in **Fig. 1**) rests on the bottom in the interior of the dialysis vessel **1** by means of foot-like or stand-like support elements **4**. The dialysis vessel **1** has here an inlet **12** as well as an outlet **13** for the dialysis liquid **2**. The level (filling state) of the dialysis liquid **2** is regulated by an adjustable floater **14** with a floater valve **15**, whereby the floater **14** is guided so as to move vertically in a

floaters guide **16**. The advantage consists in the possibility of continuously exchanging the dialysis liquid **2**. This dispenses with the adjustment of a concentration equilibrium between the dialysis liquid **2** and the sample material **6**, which is contained, in each case, in the sample containers (wells **5**), the speed of dialysis is higher, and the removal of low molecular weight substances from the sample material **6** is fundamentally improved.

[0037] **Fig. 4** shows a device for dialysis in which the dialysis vessel **1**, shown in plan view, with the sample plate **3** (compare **Fig. 1** and **Fig. 3**) mounted therein as well as with the inlet **12** and the outlet **13**, is represented as a component part of a circulating system for the flow of dialysis liquid **2**. The exchange of the dialysis liquid **2** does not take place, as in the device according to **Fig. 3**, through an open system, but rather the dialysis liquid **2** is moved through a pump **17** and a filter cartridge **18** in a line **19** as circulation through the dialysis vessel **1**. The path (direction) of the dialysis liquid **2** is indicated by arrows, whereby the black arrows symbolize the outlet direction of the dialysis liquid **2**. When it leaves the dialysis vessel **1**, the dialysis liquid **2** may be enriched, for example, with ions and / or detergents from the sample material **6**. By means of one or more sorbents in the filter cartridge **18**, it is possible to remove these constituents from the circulation. The purified dialysis liquid **2** thus returns, as indicated by the white arrows, to the dialysis vessel **1**. Appropriately, here, the ability to use repeatedly the dialysis solution **2** is connected with the stated avoidance of adjusting a concentration equilibrium between the dialysis liquid **2** and the sample material **6**, which is contained, in each case, in the sample containers (wells **5**) and with the advantages for the dialysis that are associated therewith (see embodiment example in regard to **Fig. 3**).

[0038] **Fig. 5** shows a device for dialysis (once again in sectional front view and plan view), in which the sample plate **3** is neither fixed in place on the floor of the dialysis vessel **1** (compare **Fig. 1**) nor arranged in a floating manner on the dialysis liquid **2** in the dialysis vessel **1** (compare **Fig. 2**), but rather is supported by a support **20**, which is connected through a shaker arm **21** with a shaker **22**. Shaker **22** serves, as indicated by the white crossed arrows in **Fig. 5**, for

horizontal movement of the sample plate **3** above the surface of the dialysis liquid and it moves the sample plate **3** in the range of amplitude and frequency of shakers for microtiter plates that are in themselves known in laboratory operation. In this way, the sample material **6** situated in the sample containers (wells **5**) of the sample plate **3** is mixed together, this [shaking] acting to counter the formation of concentration gradients in the sample material **6** as well as in the dialysis liquid **2** to which the shaking motion is imparted. In addition, the formation of secondary membranes, which especially hinders many dialysis processes, is prevented.

[0039] The advantage of this device is the fact that, even when it is also combined, if need be, with the change of the dialysis liquid **2** or its circulation and purification, as described in the embodiment examples in regard to **Fig. 3** and **Fig. 4**, it is possible to increase the speed and completeness of the dialysis. The combined representation with said previously described embodiment examples is not included separately in the drawing for reasons of clarity. In a further embodiment that is not shown here, the mixture of samples and dialysis liquid can take place as well by the insertion of an ultrasonicing mixer, which has the positive effects mentioned.

[0040] **Fig. 6** shows (likewise in sectional front view and plan view) a device for dialysis in which the sample plate **3** (as in **Fig. 2**) floats on the surface of the dialysis liquid **2**. The sample plate does not have, as in the previously described examples, sample containers with cylindrically parallel container walls, but rather conically shaped wells **5a** in the form of a truncated cone, each container with a larger bottom opening that is closed by the dialysis membrane **7** as well as a comparatively smaller top opening. These small top openings form an advantageous form-fitting closure (compare **Fig. 7**) for transfer of the sample material **6** after the dialysis into individual volumes (present in the same grid pattern) of other sample-collecting plates, particularly of the microtiter plate technology that is in itself known. Readily evident in the plan representation of **Fig. 6** is also the adhesive film **9** above the grid arrangement of the

sample containers (wells **5a**), which prevents an evaporation, spillage, and contamination of the sample material **6** situated in the wells **5a** during the dialysis or else during transport.

[0041] **Fig. 7** and **Fig. 8** show schematically, each in sectional representation through the plate, the course of such a method for transferring the dialyzed sample material by means of centrifugation from the sample plate **3**, with conical sample containers (compare **Fig. 6**) into a collecting plate **23** with cylindrical sample containers. The collecting plate **23** is turned over and placed on the sample plate **3** and centrifuged together with the latter. By means of the centrifugation, the sample material **6** that is initially situated in the sample plate **3** is transferred into the collecting plate **23**. Subsequently, the sample plate **3** and the collecting plate **23** are separated from each other once again. As the centrifuge, it is possible to employ a laboratory centrifuge for microtiter plates, which is in itself known. In **Fig. 7**, the top openings of the wells **5** are smaller than the openings of the sample containers of the collecting plate **23** that face them, this ensuring the already described good form-fitting closure through the interlocking of the sample containers that is indicated in the drawing. In **Fig. 8**, by contrast, the mutually facing openings of the sample containers of the sample plate **3** and of the collecting plate **23** are each of the same size. Here, a requisite tight form-fitting closure is ensured by a seal **24** arranged between the sample plate **3** and the collecting plate **23**.

[0042] In the following four application examples, it is shown how different substances were dialyzed with the devices described.

## Application Example 1

[0043] A device that provides for mounting the sample plate 3 in a shaking device according to Fig. 5 and that is incorporated into a circulating system for the dialysis liquid 2 according to Fig. 4 is intended for use to remove low molecular weight substances, such as p-nitrophenol (p-NP) and sodium chloride, from 96 samples in short dialysis times in a uniform and simultaneous manner.

[0044] To this end, 100  $\mu$ L of a 1.5 mM p-NP solution in 50 mM diethanolamine buffer pH = 9.8 (DEA), which additionally contains 750 mM NaCl, is pipetted into each well of the 8  $\times$  12 dialysis vessel, which is closed with a VSWP Millipore membrane (0.025  $\mu$ m), and dialyzed against an only 11-fold larger volume of 110 mL of deionized water for 2 hours. The dialysis liquid 2 is circulated by use of a peristaltic pump. Integrated in the circulation is a deionization column (Eco Pac, 10 mL, Bio-Rad) (compare Fig. 4). During the dialysis, the sample plate 3, which is closed with the adhesive film 9 and is fixed in place in the holder 20 of the shaking device (see Fig. 5), is constantly shaken. The effectiveness of the separation of the low molecular weight p-nitrophenol is checked after the dialysis by comparison of the absorptions at 405 nm of the dialyzed samples with the absorptions of the starting solution. For the absorption measurement of the starting solution employed in the dialysis, the absorptions are read in a reader after dilution with DEA buffer solution pH = 9.8 in a microtiter plate. For absorption measurement of the 96 dialyzed samples, aliquots were taken from the sample plate 3 by use of a multipipette, mixed with a 50 mM DEA buffer solution pH = 9.8 in a microtiter plate, and read in a reader.

[0045] A comparison of the absorptions in the 96 positions of the dialysis module is shown in Table 1. The measured absorptions are reduced by the blank value of the buffer.



Table 1

Comparison of the absorptions at 405 nm ( $A_{405}$ ) before and after dialysis

Sample	$A_{405}$ of analysis solution Mean value (n = 96)	Dilution factor Analysis solution	$A_{405}$ Total	p-NP (%)
p-NP before dialysis	$0.397 \pm 0.005$	30	11.910	100
p-NP after dialysis	$0.028 \pm 0.002$	3.75	0.105	0.88

**[0046]** The values show that, under the conditions described, more than 99% of the p-NP could be removed. The scatter of the absorption values after dialysis shows that the speed of dialysis is very similar in all 96 dialysis containers.

**[0047]** In addition to the comparison of the absorptions before and after the dialysis, the conductivity of the employed samples (6) was measured as well and compared with the conductivity after the dialysis from the 96 dialysis containers. Determined from these values was a residual conductivity in comparison to the starting solution of 0.2%, which also confirms the effectiveness of the dialysis.

### Application Example 2

**[0048]** For the separation of low molecular weight ions from proteins, 75  $\mu$ L of a concentrated solution of alkaline phosphatase (14.5  $\mu$ g/mL) in 1 M DEA buffer pH = 9.8 was placed in each of  $8 \times 11$  positions of the sample plate 3 and dialyzed for 1 hour against a large volume of 470 mL of deionized water. The sample plate 3, which is placed on a polystyrene

frame as floating element **10**, floats on the dialysis liquid **2**, which is kept in motion by means of the magnetic stirrer **8** (compare **Fig. 2**). The continuous decrease in the low molecular weight substances in the sample containers (wells **5**) is followed by measuring the conductivity (compare **Fig. 9**) in the dialysis liquid **2**. After 60 min of dialysis, 96% of the dialyzable ions have been removed. The determination of the enzymatic activities of the alkaline phosphatase in the **88** occupied dialysis vessels of the sample plate **3** and a comparison of the enzymatic activity with the starting solution gave a recovery of the enzyme activity of  $90.4 \pm 4.3\%$ .

### Application Example 3

**[0049]** By way of Triton X-100 (TX-100) as example, it was intended to check whether it is possible to remove this often utilized detergent from analysis samples by dialysis. To this end, the sample plate **3** is loaded with 75  $\mu\text{L}$  of a 0.5% aqueous solution of Triton X-100 in each well and dialyzed against tap water for 8 hours. The sample plate **3** is closed with the adhesive film **9**, introduced back into the holder **20** of the shaking device (compare **Fig. 5**), and constantly shaken. During this process, the plate is immersed in 170 mL of tap water as dialysis liquid **2**, which is replenished in a circulating system according to **Fig. 4** at a flow rate of 170 mL/min.

**[0050]** In order to record possible volume changes, the sample plate **3** is weighed before and after dialysis. For testing the effectiveness of the Triton removal by dialysis, aliquots are taken from the dialysis vessels of the module by use of a multipipette, mixed with 30% n-propanol in a microtiter plate, and measured in a fluorescence reader at an excitation wavelength of 270 nm according to an emission wavelength of 310 nm. The Triton X-100 solution employed for the dialysis is measured in a microtiter plate under the same conditions

after dilution in 30% n-propanol. For correction of the measured values and for control of the linearity of the measurement range, both the propanol solution in 56 positions of the microtiter plate (blank values) and three calibration concentrations of Triton X-100 between 12.5 and 50  $\mu\text{M}$  are measured under the same conditions. The results are summarized in Table 2. The measured mean values are reduced by the averaged propanol blank value.

Table 2

Comparison of the fluorescences before and after dialysis

Sample	Fluorescence of analysis solution Mean value (n = 96)	Dilution factor Analysis solution	Fluorescence Total	TX-100 (%)
TX-100 before dialysis	$739.6 \pm 11.83$	201	148,660	100
TX-100 after dialysis	$62.39 \pm 6.24$	30	1,872	1.26

**[0051]** The measured fluorescences after dialysis in the 96 dialysis vessels of the sample plate 3 show that, under the described conditions, 98.7% of the Triton X-100 can be removed uniformly from all 96 dialysis containers.

#### Application Example 4

**[0052]** The sample plate 3 can also be used for the simultaneous concentration of 96 samples. To this end, 100  $\mu\text{L}$  of a 0.3% dextran blue solution is pipetted into each of the sample containers (wells 5) of the sample plate 3 by using a multipipette. The sample plate 3 is subsequently fixed on the floating frame 10 (compare Fig. 2) made of polystyrene, which is placed on 100 mL of a 30% aqueous polyethylene glycol solution (PEG 40,000). After 45 min, the volume reduction was determined quantitatively. To this end, 30  $\mu\text{L}$  were taken from each of

88 wells of 96 positions by using a multipipette and pipetted into a microtiter plate, each container of which contained 120  $\mu\text{L}$  of 50 mM DEA buffer solution. Into each of the remaining 8 positions of the microtiter plate, 30  $\mu\text{L}$  of reference solution (0.3% dextran blue solution) were added in place of the sample solution. The microtiter plate was measured in a reader at 620 nm after intense mixing. A comparison of the averaged absorbances of samples and reference solution shows the absorbances measured under the conditions described (Table 3).

Table 3

Comparison of the absorbances of dextran blue before and after concentration

Samples	$A_{620}$
Reference solution	$0.291 \pm 0.012$ (n = 8)
Samples after concentration	$0.465 \pm 0.020$ (n = 88)

**[0053]** The absorbances have increased by a factor of 1.6. This means that, after 45 min, the volume of the samples has decreased by 37.5  $\mu\text{L}$ , this having occurred relatively uniformly, as shown by the scatter.

#### List of the Reference Numbers Used

- 1 dialysis vessel
- 2 dialysis liquid
- 3 sample plate
- 4 support

- 5, 5a** well
- 6** sample material
- 7** dialysis membrane
- 8** magnetic stirrer
- 9** adhesive film
- 10** floating element
- 11** ventilation hole
- 12** inlet
- 13** outlet
- 14** floater
- 15** floater valve
- 16** floater guide
- 17** pump
- 18** filter cartridge
- 19** line
- 20** holder
- 21** shaker arm
- 22** shaker
- 23** collecting plate
- 24** seal

### Patent Claims

1. A sample plate for use in dialysis systems with sample containers, each of which are separated by means of a semipermeable membrane from a dialysis liquid situated in a dialysis

vessel, **hereby characterized in that** the sample plate (3) contains a plurality of identical sample containers (5), which are arranged in a grid ( $n \times 8 \times 12$ ) that is in itself known and which are suitable for the liquid handling technique of microplate technology, the top ends of which are open and the bottom ends of which are closed by membranes (7) lying in a plane, in that, in the grid region of the sample containers (5), the sample plate (3) does not have any regions or elements that protrude beyond the plane of the dialysis membranes (7) and form or promote gas barriers in the dialysis liquid (2) during proper use, and in that, in the edge regions, the sample plate (3) has elements – for example, openings (11) – allowing the escape of air after immersion in the dialysis liquid (2).

2. The sample plate according to claim 1, further characterized in that it comprises a plate (3) with cylindrical wells (5) as sample containers.
3. The sample plate according to claim 1, further characterized in that the sample containers (5) are designed with a capacity for microliter volumes.
4. The sample plate according to claim 1, further characterized in that it has the external dimensions of microtiter plates that are in themselves known.
5. The sample plate according to claim 1, further characterized in that the bottom ends of the sample containers are each closed by individual dialysis membranes (7).
6. The sample plate according to claim 1, further characterized in that the bottom ends of the sample containers are closed by one or more common dialysis membranes (7).
7. The sample plate according to claim 1, further characterized in that the dialysis membranes (7) consist of several membrane layers.
8. The sample plate according to claim 1, further characterized in that the sample plate (3) is sprayed onto the dialysis membranes (7).
9. The sample plate according to claim 1, further characterized in that the dialysis membrane (7) is fixed adhesively to the bottom side of the sample plate (3).

10. The sample plate according to claim 1, further characterized in that the dialysis membrane (7) is bonded, welded, or sprayed onto the bottom side of the sample plate (3).
11. The sample plate according to claim 1, further characterized in that an adhesive film (9) is provided as a detachable closure of the top ends of the sample containers (5).
12. The sample plate according to claim 1, further characterized in that a cover is provided as a detachable closure of the top ends of the sample containers (5).
13. The sample plate according to claim 1, further characterized in that, for the dialysis, it is situated in a dialysis vessel (1), which has at least one inlet (12) as well as at least one outlet (13), which is preferably connected to a floater valve (15), for the dialysis liquid (2).
14. The sample plate according to claim 13, further characterized in that, between the at least one outlet (13) and the at least one inlet (12), means (18) for the removal of the substances to be dialyzed from the dialysis liquid (2) are provided.
15. The sample plate according to claim 14, further characterized in that these means consist of at least one ion exchanger.
16. The sample plate according to claim 14, further characterized in that these means are designed as detergent-binding adsorbers.
17. The sample plate according to claim 14, further characterized in that these means contain chelate-forming substances.
18. The sample plate according to claim 13, further characterized in that the flow quantity of the dialysis liquid (2) passing through the at least one inlet (12) and through the at least one outlet (13), or through valves or control elements, is adjustable in each case.
19. The sample plate according to claim 13, further characterized in that the dialysis vessel (1) with its at least one inlet (12) and with its at least one outlet (13) is a component part of a circulating system for the dialysis liquid (2) that is moved by a circulation pump (17).

20. The sample plate according to claim 1, further characterized in that it is supported in the dialysis vessel (1) by, for example, foot-like or stand-like elements (4) that rest on the vessel bottom.
21. The sample plate according to claim 1, further characterized in that it is supported by means of one or more floating elements (10) in the dialysis liquid (2) of the dialysis vessel (1).
22. The sample plate according to claim 1, further characterized in that it is connected with means (22, 21) for the movement and mixing together of at least the liquid (6) contained in the sample containers (5).
23. The sample plate according to claim 22, further characterized in that these means consist of a shaker (22) that is in itself known.
24. The sample plate according to claim 22, further characterized in that these means consist of an ultrasonication source.
25. The sample plate according to claim 1, further characterized in that it is situated in a dialysis system that has control elements in the dialysis liquid (2).
26. The sample plate according to claim 25, further characterized in that these control elements are a means for the simultaneous measurement of conductivity.
27. The sample plate according to claim 25, further characterized in that these control elements are a means for the simultaneous measurement of optical density.
28. The sample plate according to claim 25, further characterized in that these control elements are fluorescence detectors.
29. The sample plate according to claim 25, further characterized in that these control elements are thermometers.
30. The sample plate according to claim 25, further characterized in that the control elements are employed for the control of the dialysis process.
31. The sample plate according to claim 1, further characterized in that, for the purpose of sample transfer by means of, for example, centrifugation, a collecting plate (23) that can be



turned over and set on the sample plate (3) and has a plurality of sample containers is provided, the grid arrangement of which ( $n \times 8 \times 12$ ) coincides with the grid of the sample containers (5) of the sample plate (3).

32. The sample plate according to claim 31, further characterized in that the sample container openings of the corresponding sample containers of the collecting plate (23) and of the sample plate (3), when the collecting plate (23) is set in place, are different respectively and preferably each interlock with the other for a form-fitting closure.

33. The sample plate according to claim 32, further characterized in that the sample containers (5) of the sample plate (3) have a conical design, whereby the bottom larger openings are closed by the dialysis membranes (7) and the top openings of the sample containers (5) are each smaller than the corresponding sample container openings of the collecting plate (23) when the collecting plate (23) is set in place.

34. The sample plate according to claim 31, further characterized in that the openings of the corresponding sample containers of the collecting plate (23) and of the sample plate (3), when the collecting plate (23) is set in place, are identical in size.

35. The sample plate according to claim 31, further characterized in that means for a better form-fitting closure for sealing between the sample plate (3) and the collecting plate (23) – for example, a gasket or paste – are provided.

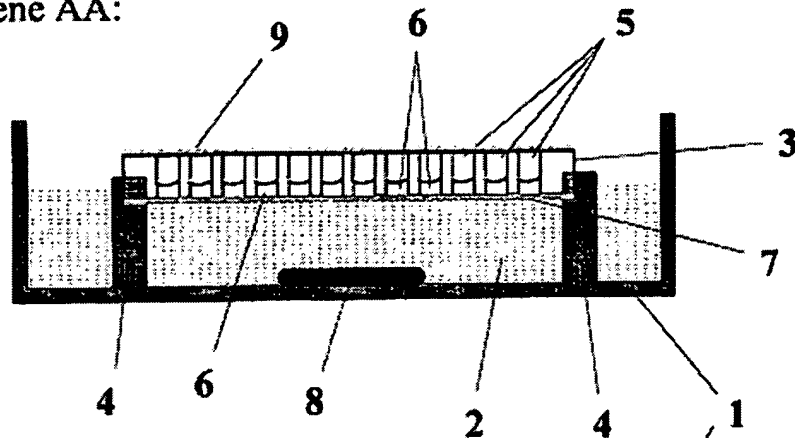
---

9 pages of drawings attached hereto

---

a) Sectional plane AA:

a) Schnittebene AA:



b) Plan view

b) Draufsicht:

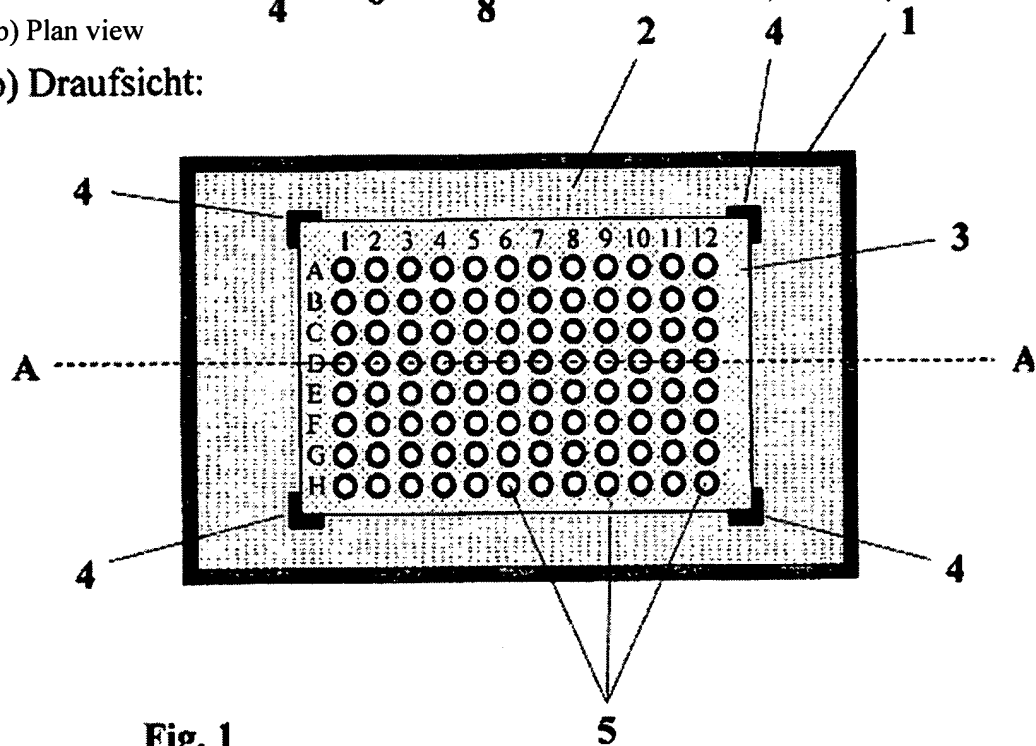
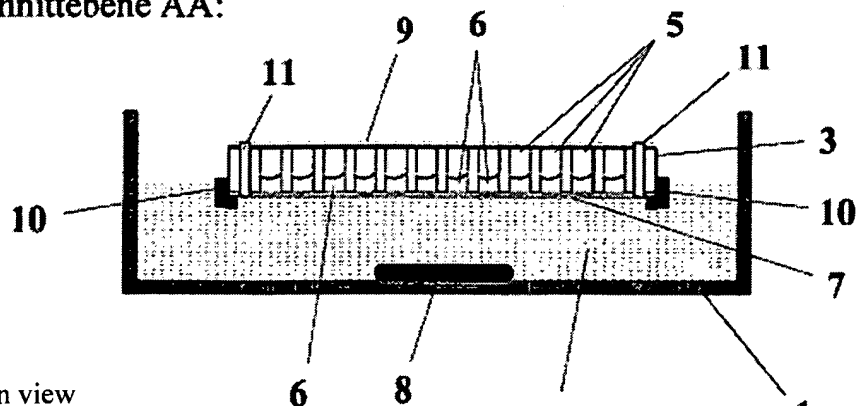


Fig. 1

a) Sectional plane AA:

a) Schnittebene AA:



b) Plan view

b) Draufsicht:

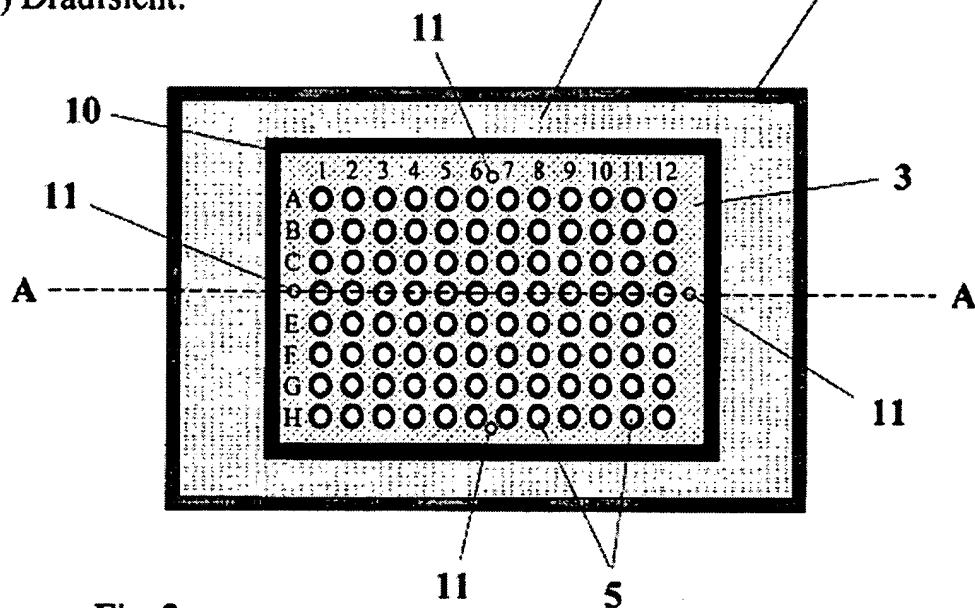
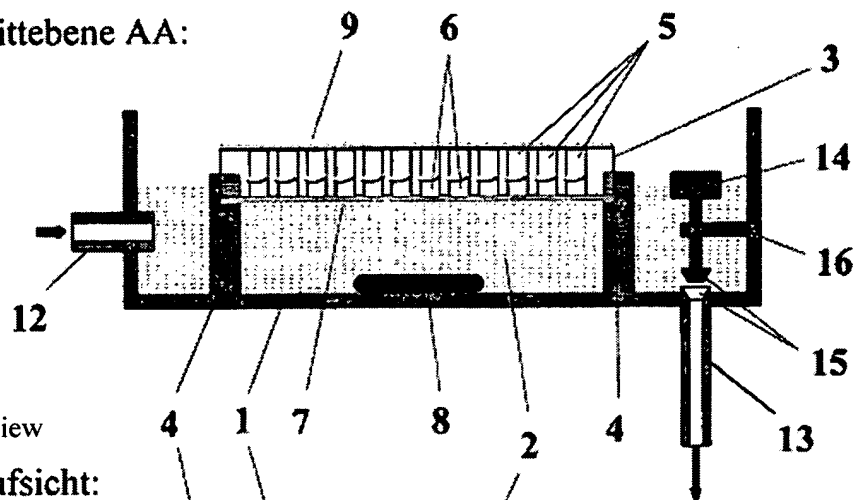


Fig. 2

Fig. 2

a) Sectional plane AA:

a) Schnittebene AA:



b) Plan view

b) Draufsicht:

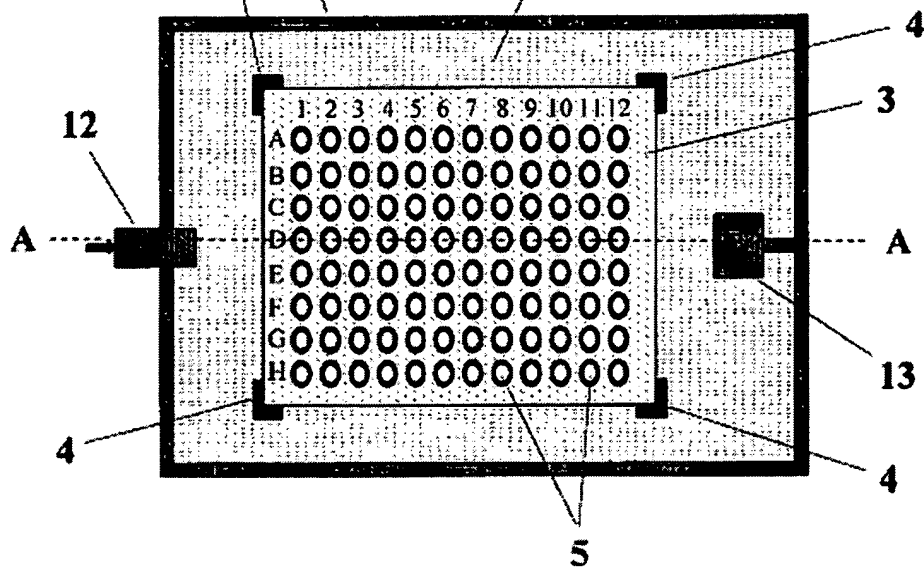


Fig. 3

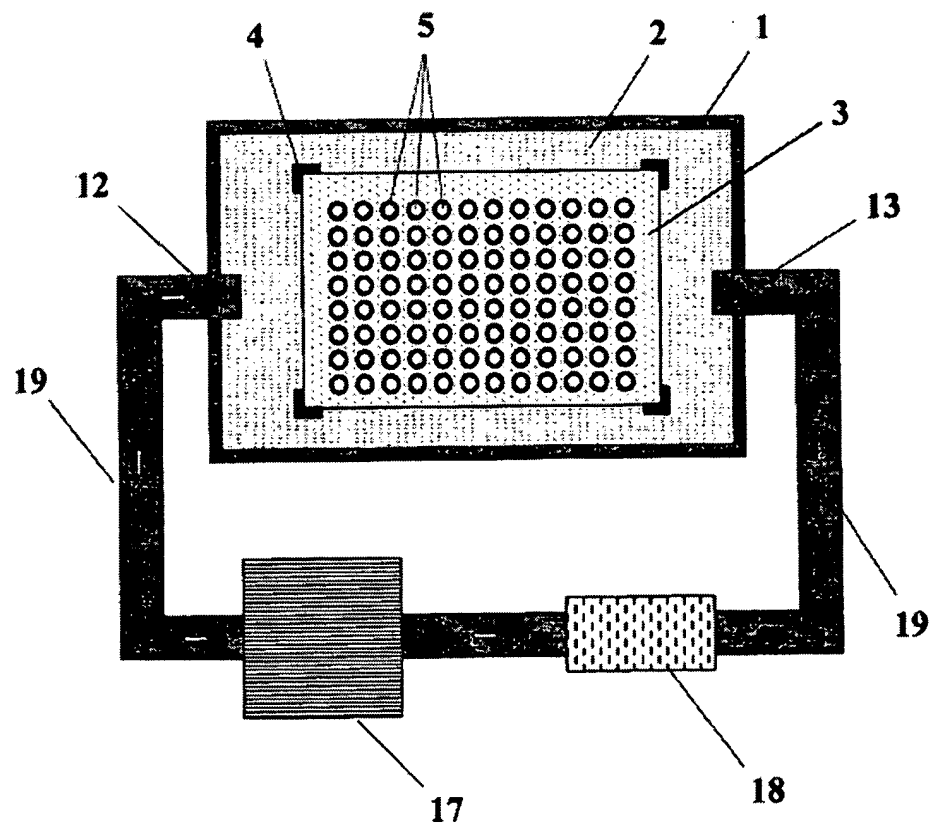
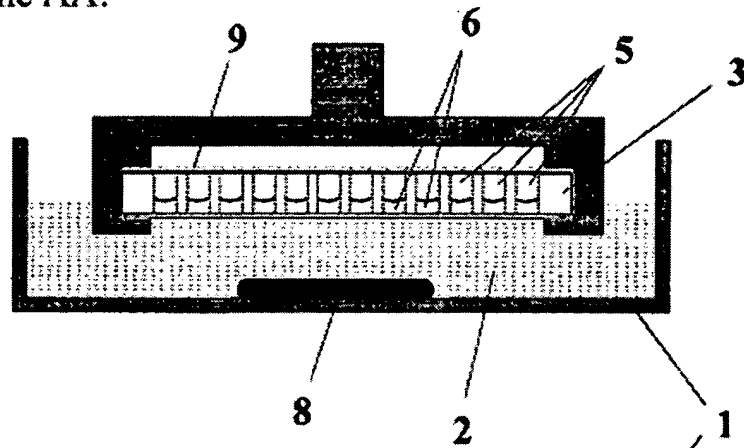


Fig. 4

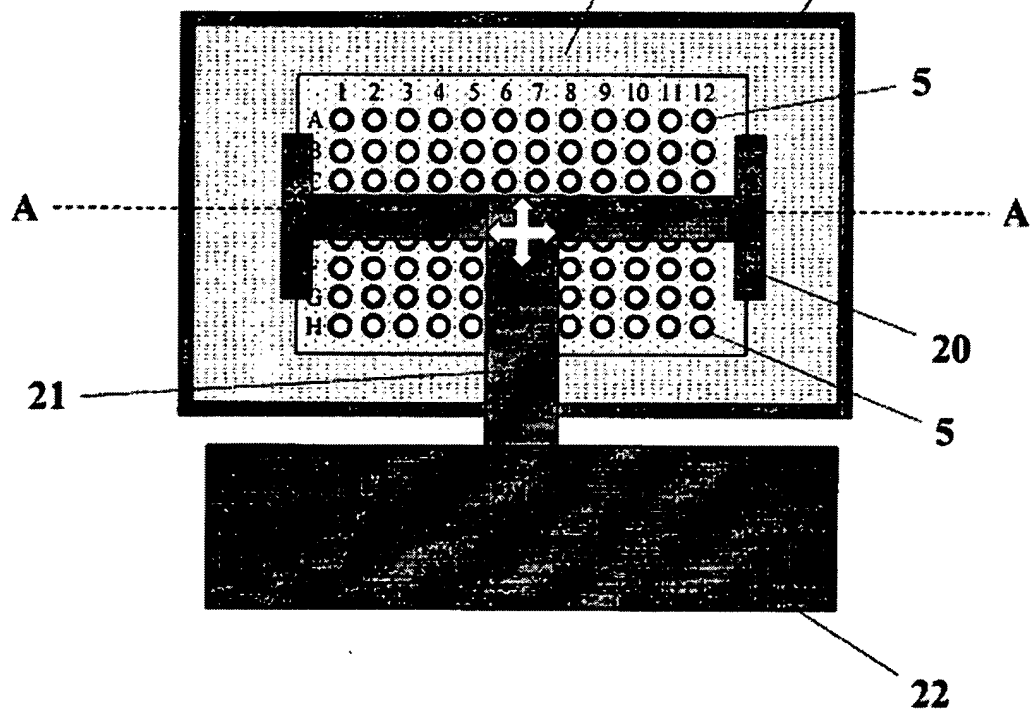
a) Sectional plane AA:

a) Schnittebene AA:



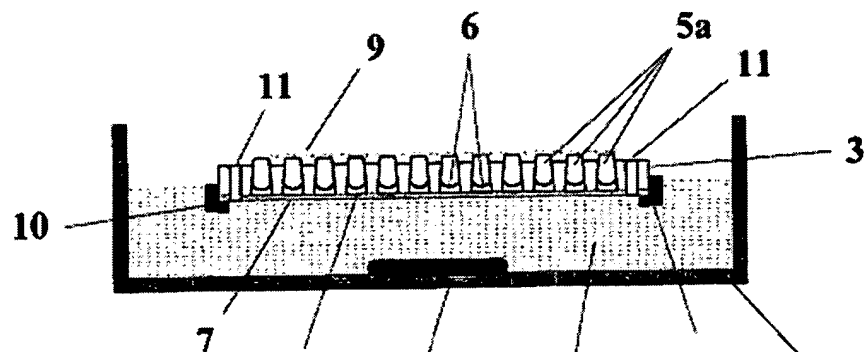
b) Plan view

b) Draufsicht:



**Fig. 5**

a) Sectional plane AA:  
 a) Schnittebene AA:



b) Plan view

b) Draufsicht:

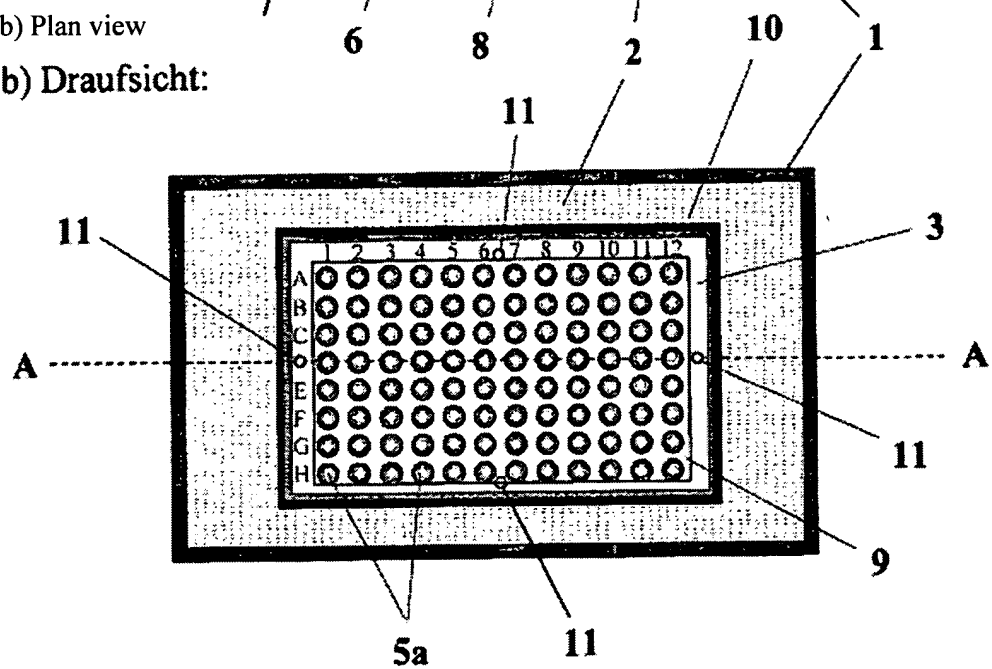
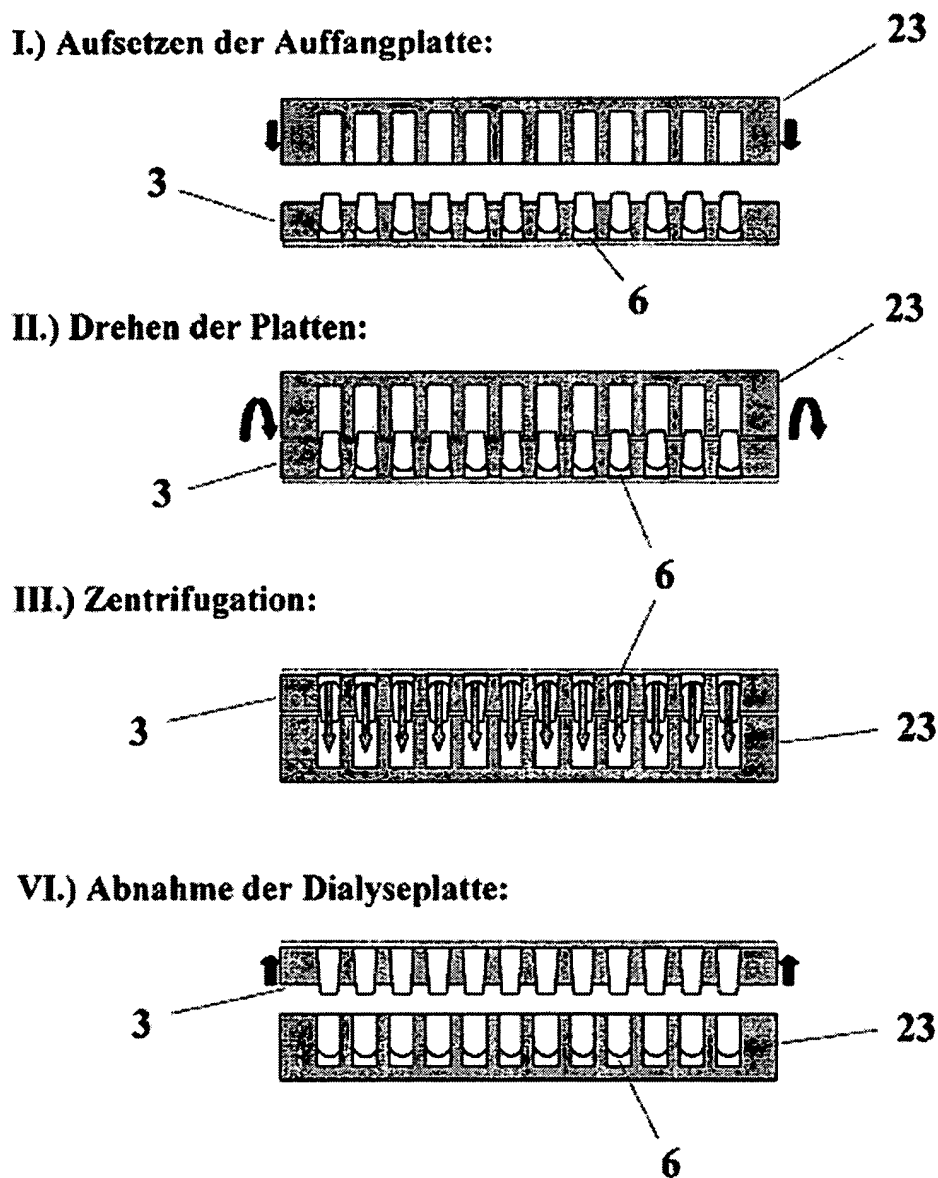


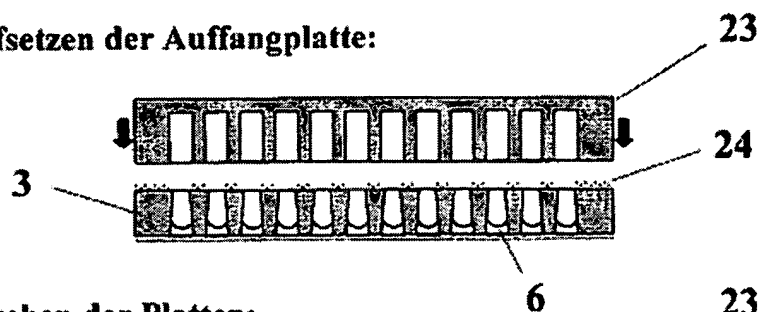
Fig. 6



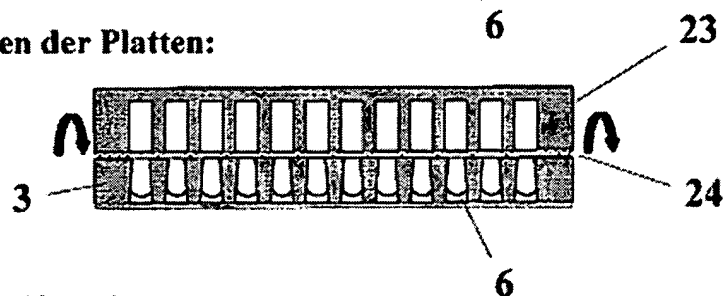
**Fig. 7**

- I.) Placing on the collecting plate:  
 II.) Turning the plates over:  
 III.) Centrifugation:  
 IV.) Removing the dialysis plate:

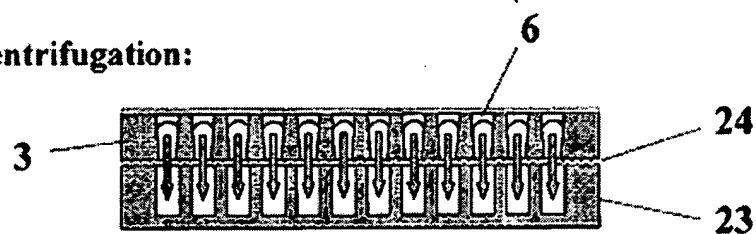
**I.) Aufsetzen der Auffangplatte:**



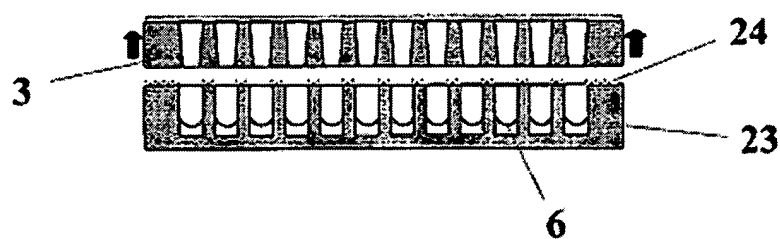
**II.) Drehen der Platten:**



**III.) Zentrifugation:**

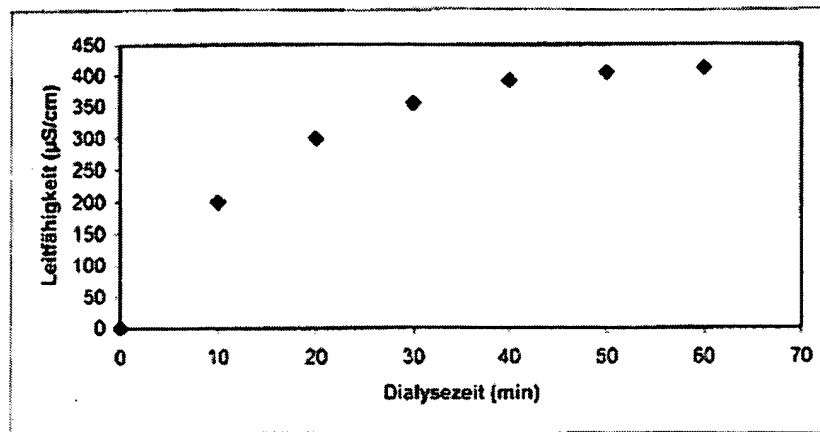


**VI.) Abnahme der Dialyseplatte:**



**Fig. 8**

- I.) Placing on the collecting plate:
- II.) Turning the plates over:
- III.) Centrifugation:
- IV.) Removing the dialysis plate:



**Fig. 9**

y-axis: Conductivity (µS/cm)  
x-axis: Dialysis time (min)

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

①② **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 60 975 A 1**

⑦① Aktenzeichen: 101 60 975.2  
⑦② Anmeldetag: 10. 12. 2001  
⑦③ Offenlegungstag: 18. 6. 2003

⑤① Int. Cl. 7:  
**B 01 L 3/00**  
A 61 M 1/14  
B 01 D 61/24  
G 01 N 33/48  
C 12 M 3/00

DE 101 60 975 A 1

⑦① Anmelder:  
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE

⑦② Erfinder:  
Horn, Anton, Prof. Dr., 07749 Jena, DE; Kreusch,  
Stefan, Dr., 07751 Bucha, DE; Sammler, Günther,  
07749 Jena, DE; Bublitz, Renate, Dr., 07743 Jena,  
DE; Schwedter, Sina, 99817 Eisenach, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
zu ziehende Druckschriften:

DE 197 12 484 C2  
DE 27 33 214 A1  
DE 94 09 089 U1  
GB 21 88 418 A  
US 60 83 761  
US 58 01 055  
US 56 50 323  
US 55 87 321  
US 54 17 923  
US 53 26 533  
US 49 48 564  
US 46 73 651  
US 44 50 076  
US 5 55 456  
EP 04 08 940 A1  
EP 01 31 934 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤③ Probenplatte zur Verwendung in Dialysesystemen

⑤④ Aufgabe war es, simultan eine Vielzahl von Mikroproben im  $\mu$ l-Bereich essentiell gleichmäßig, gut handhabbar und möglichst aufwandgering zu dialysieren, wobei diese Dialyse unter den Anforderungen der modernen Screening- und Analysemethoden mit hohem Probendurchsatz, schnell sowie ggf. automatisierbar durchzuführen sein soll.

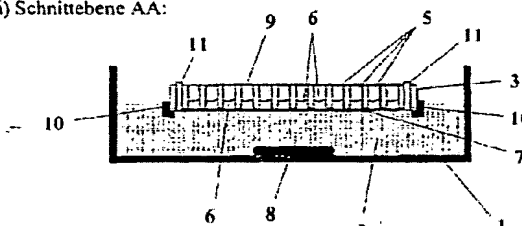
Die Dialyse soll auch bei hohem Probendurchsatz eine hinreichend hohe Wiederfindung von kleinen Volumina für sekundäre Prozeduren erlauben.

Erfindungsgemäß enthält die Probenplatte (3) eine im an sich bekannten Raster ( $n \times 8 \times 12$ ) angeordnete Vielzahl gleicher Probengefäße (5), passend zur Liquidhandling-technik für die Mikroplattentechnologie, deren obere Enden offen und deren untere Enden durch in einer Ebene liegende Membranen (7) verschlossen sind. Im Rasterbereich der Probengefäße (5) weist die Probenplatte (3) keine die Ebene der Membranen (7) überragende und beim bestimmungsgemäßen Einsatz in der Dialyseflüssigkeit (2) Gasbarrieren bildende oder unterstützende Bereiche oder Elemente auf.

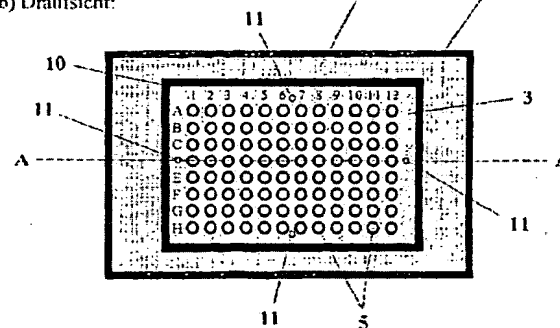
Im Randbereich besitzt die Probenplatte (3) Elemente zum Entweichen von Luft nach Eintauchen in die Dialyseflüssigkeit.

Die Erfindung kann in verschiedenartigsten Dialysesystemen u. a. dort Anwendung finden, wo für analytische Zwecke insbesondere eine große Anzahl von Mikroben von ihren die Analyse störenden niedermolekularen Bestandteilen getrennt werden müssen.

a) Schnittebene AA:



b) Draufsicht:



DE 101 60 975 A 1

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Probenplatte mit Probengefäßen zur Aufnahme von Flüssigkeiten für eine Dialysetrennung über mindestens eine semipermeable Membran und eine Dialyseflüssigkeit. Eine solche Probenplatte kann überall dort Anwendung finden, wo für analytische Zwecke insbesondere eine große Anzahl von Mikroproben, deren makromolekulare Anteile untersucht werden sollen, von ihnen, die Analyse störenden niedermolekularen Bestandteilen möglichst aufwandgering, effizient und gut handhabbar getrennt werden müssen. Außerdem wird sie vorteilhaft eingesetzt, um Makromoleküle enthaltende Mikroproben schnell, schonend und ohne große Verluste zu konzentrieren. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist das Umpuffern von Proben, insbesondere im Bereich der DNA-Bearbeitung, für die Untersuchung von Proteinen und bei sequentiell erfolgenden enzymatischen Reaktionen.

[0002] In den letzten Jahren haben, insbesondere ausgelöst durch die Bemühungen der Pharmaindustrie zur Gewinnung von "targets" für die Entwicklung neuer Pharmaka, hochparallelisierte Screeningverfahren (High throughput screening = HTS und Ultra High throughput screening = UHTS) mit extrem hohen Analysefrequenzen Einzug in die Analytik gefunden. Auch die Proteomanalytik, die sich gegenwärtig außerordentlich stark entwickelt, erfordert sehr hohe Probandurchsätze zur Charakterisierung der Vielzahl von Proteinen eines Proteoms mit ihren biologischen Modifikationen sowie für verschiedene Zustände, wie beispielsweise gesund und krank. Außerdem wird für viele Anwendungsgebiete in der biochemischen und biotechnologischen Forschung die Hochdurchsatzanalyse, beispielsweise zur Charakterisierung von Enzymen über ihre Aktivität, zur Charakterisierung von analytischen und präparativen chromatographischen Trennungen, zur massenhaften Renaturierung von Proteinproben und zur Charakterisierung von Nukleinsäuren, ein unverzichtbares Hilfsmittel.

[0003] Diese Hochdurchsatzverfahren haben zur Entwicklung spezieller Analyseverfahren und in ihrem Umfeld zu passfähigen Hilfstechniken geführt, die sich um das Mikrotiterplattenraster von  $8 \times 12$  Analysepositionen pro Grundfläche der Platte von circa  $12,6 \text{ cm} \times 8,5 \text{ cm}$  gruppieren. Gegenwärtig ist ein Trend zur weiteren Verdichtung der Analysepositionen auf der gleichen Grundfläche von  $n \times 8 \times 12$  für  $n = 4$ ,  $n = 16$  und noch dichter besetzten Analyseplatten zu beobachten.

[0004] Sehr häufig sind es makromolekulare Substanzen wie DNA und ihre Bruchstücke, Proteine und Peptide, Glykoproteine und synthetische Makromoleküle sowie Kombinationen der aufgeführten Stoffe, die von Interesse sind.

[0005] Zwei weitere neue analytische Verfahren MALDI-MS = Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry und ESI-MS = Elektrospray Ionisation Mass Spectrometry wurden erst vor wenigen Jahren entwickelt und haben sich als unverzichtbare Verfahren für HTS/UHTS und für die Proteomanalytik, hier insbesondere in Kombination mit Proteaseverdauungsmethoden, erwiesen. Insgesamt ist ein starker Trend zur Miniaturisierung der analytischen Verfahren zu erkennen. Viele der für Hochdurchsatzscreening verwendeten Verfahren setzen eine besondere Probenvorbereitung mit hohen Anforderungen voraus. Solche Anforderungen sind:

1. Die Proben dürfen nur eine niedrige Salz- oder Detergenzkonzentration besitzen, oder sie müssen in einem definierten Ionennilieu vorliegen.
2. Die Proben, die im  $\mu\text{l}$ -Volumenbereich vorliegen, müssen hochparallelisiert hantiert werden, um die erforderliche Analysefrequenz zu garantieren. Die Behandlung muss unter standardisierten Bedingungen für alle Proben gleichmäßig erfolgen.
3. Die Wiederfindung muss für diese Mikroproben im Prozess der Probenvorbereitung hinreichend hoch sein.
4. Häufig müssen Proben aus biologischem Material vor der Analyse schonend konzentriert werden, um die notwendige Zielkonzentration zu erreichen.

[0006] Zur Entfernung niedermolekularer Substanzen, zur Überführung von Proben in ein definiertes Milieu und zur Konzentrierung von makromolekularen Substanzen hat sich das Dialyseverfahren unter Verwendung semipermeabler Membranen bewährt. So gibt es eine größere Anzahl von Anbietern für Dialyseverfahren, die beispielsweise im Internet unter der Adresse [http:// biosupplynet.com](http://biosupplynet.com) zusammengestellt sind.

[0007] Hauptanstrengungen der Firmen und Erfinder zur Verbesserung der Dialysetechnik richten sich im wesentlichen darauf, Probleme bei der praktikablen Handhabung der Technik, wie beispielsweise Mischprobleme, Wiederfindungsprobleme von Makromolekülen, Probleme mit der Geschwindigkeit des Dialyseprozesses und Probleme, die im Zusammenhang mit kleinen Volumina ( $\mu\text{l}$ -Bereich) auftreten, zu überwinden.

[0008] Für MALDI- und ESI-MS-Verfahren ist nach dem bekannten Stand der Technik meist eine Entfernung von Salzen, Detergenzien und anderen kontaminierenden Substanzen notwendig.

[0009] Möglichkeiten, die Qualität der essentiellen Mischung einer Dialyselösung an sich zu verbessern, werden in der US 5,183,564 und in der US 6,176,609 beschrieben. Die letztgenannte Schrift bezieht sich auf ein allgemeines Verfahren zur Mischung in einer Anzahl von Gefäßen. Dem allgemeinen Trend zur Miniaturisierung Rechnung tragend, sind eine Reihe von Lösungen vorgeschlagen worden. So sind in der US 6,039,871 Vorrichtungen genannt, die als Wegwerfmateriale vorgesehen sind und die Dialyse von  $10\text{--}100 \mu\text{l}$  Proben in speziellen zusammensteckbaren Gefäßen vorsehen. In der US 5,733,442 wird ein geschlossenes Mikrodialysesystem vorgestellt, welches zusammenschraubbare Mikrokanäle mit zwei Dialysmembranen und eine besondere Röhreinrichtung besitzt.

[0010] Der Problematik der Wiederfindung von kleinen Analysevolumina wird durch Einführung einer speziellen Aufangkammer in der US 6,217,772 Aufmerksamkeit geschenkt. In den Schriften US 5,783,075 und US 5,503,741 wird ein Vorschlag zur schwimmenden Dialyse in speziell konfigurierten Gefäßen unterbreitet. Für die schwimmende Dialyse gibt es auch Angebote der Firmen PGC, der Firma Daigler und der Firma Pierce mit den weit verbreiteten Slide-Dialysesystemen.

[0011] Zur Erhöhung der Dialysegeschwindigkeit unter besonderer Berücksichtigung der ESI-MS Technik wird ein Kapillardialysesystem in der US 5,954,959 vorgeschlagen. Für die Dialyse einer Vielzahl von Proben gibt es Vorschläge in der US 4,450,076, in der die Dialysegefäße um eine zentrale Achse angeordnet sind und durch Drehung bewegt wer-

den, Angebote von PGC scientific sehen ebenfalls um eine zentrale Achse angeordnete Gleichgewichtsdialysekammern vor, die mit teflonbeschichteten Schrauben abgedichtet werden. Von Pierce wird ein Mikrofluidisationssystem für 12 x 20 100 µl-Volumina angeboten.

[0012] Die vorgeschlagenen Lösungen sind jedoch für die Anforderungen hoher Durchsätze, wie sie für HTS, UHTS und für die Proteomanalytik notwendig sind, nicht geeignet, weil sie entweder

1. nicht passfähig zur hochparallelisierten Mikroplattentechnologie, insbesondere zur entsprechenden Liquidhandling-Technik, ausgebildet sind
2. eine simultane und essentiell gleichmäßig für alle Proben erfolgende Dialyse großer Probenzahlen im µl-Volumenbereich nicht gestatten
3. die genügend hohe Wiederfindung dieser kleinen Volumina für sekundäre analytische Prozeduren nicht erlauben
4. eine geeignet hohe Dialysegeschwindigkeit nicht vorsehen
5. unpraktikabel große Volumina für die Dialyseflüssigkeit erfordern oder
6. durch ihre komplizierte Einsatzweise unpraktikabel im Routinebetrieb mit einem hohem Durchsatz sind.

[0013] Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, simultan eine Vielzahl von Mikroproben im µl-Bereich essentiell gleichmäßig, gut handhabbar und möglichst aufwandgering zu dialysieren, wobei diese Dialyse unter den Anforderungen der modernen Screening- und Analysemethoden mit hohem Probendurchsatz, schnell sowie ggf. automatisierbar durchzuführen sein soll.

[0014] Die Dialyse soll auch bei hohem Probendurchsatz eine hinreichend hohe Wiederfindung von kleinen Volumina für sekundäre analytische Prozeduren erlauben.

[0015] Erfindungsgemäß enthält die dafür eingesetzte Probenplatte eine im an sich bekannten Raster (n x 8 x 12) angeordnete Vielzahl gleicher Probengefäße passend zur Liquidhandling-Technik für die Mikroplattentechnologie, deren obere Enden offen und deren untere Enden durch in einer Ebene liegende Dialysenmembranen verschlossen sind. Im Rasterbereich der Probengefäße weist die Probenplatte keine die Ebene der Dialysenmembranen überragende (tiefer liegende) Bereiche oder Elemente auf, die bei Verwendung der Probenplatte in die Dialyseflüssigkeit, von welcher die Probengefäße der Probenplatte durch die Dialysenmembranen getrennt sind, eintauchen und dort die Dialyse behindernde Luftbarrieren bilden oder unterstützen. Treten dennoch prozessbedingt Gase in der Berührungszone zwischen Dialyseflüssigkeit und Probenplatte auf, so können diese durch Entlüftungselemente entweichen, um in jedem Fall einen vollständigen Kontakt zwischen Dialyseflüssigkeit und Probenplatte ohne Gasbarrieren, wie Luftblasen etc., zu gewährleisten. Dieser störungsfreie Kontakt ist die Voraussetzung für eine simultane und essentiell gleichmäßig für alle Proben erfolgende Dialyse dieser großen Probenzahlen, speziell im µl-Volumenbereich.

[0016] Mit diesen vorteilhaften Merkmalen für einen bestimmungsgemäßen Einsatz kann die Probenplatte universell in verschiedenartig ausgebildeten sowie mit unterschiedlichsten Aufgaben behafteten manuellen oder automatisch betriebenen Dialysesystemen verwendet werden, unabhängig davon, ob die Probenplatte beispielsweise fest in einem Dialysegefäß oder schwimmend in der im Gefäß befindlichen Dialyseflüssigkeit gelagert wird.

[0017] Im einfachsten Fall kann die Probenplatte aus einer Platte mit zylindrischen Aussparungen als Probengefäße im Fassungsvermögen für Mikrolitervolumina bestehen. An der Unterseite der Probenplatte sind die Bohrungen (Probengefäße) entweder jeweils durch eine gemeinsame oder durch einzelne Dialysenmembranen geschlossen, welche beispielsweise an die Unterseite der Platte geklebt, geschweißt, gebondet oder gespritzt sind. Die Dialysenmembranen können auch aus mehreren Lagen bestehen.

[0018] Ein Deckel oder eine Klebefolie als lösbarer Verschluss der oberen Enden der Probengefäße schützt das in den Probengefäßen befindliche Probengut und verhindert ein Verdunsten und eine Kontamination der geringen Probenmengen im Mikroliterbereich. Es ist vorteilhaft, wenn sich die Probenplatte bei ihrem bestimmungsgemäßen Einsatz in einem Dialysegefäß befindet, welches mindestens einen Zufluss und mindestens einen Abfluss für die Dialyseflüssigkeit aufweist und so ein kontinuierliches Entfernen der zu dialysierenden Substanzen aus der Dialyseflüssigkeit ermöglicht. Das Dialysegefäß kann auf diese Weise Bestandteil eines Kreislaufsystems sein, in welchem die erfindungsgemäße Probenplatte die Dialyseflüssigkeit berührt. In diesem Kreislaufsystem, beispielsweise in einer pumpengesteuerten Umlaufeinrichtung, können Ionenaustauscher oder Detergenzien bindende Adsorber angeordnet sein, welche die Konzentration der aus der Probe zu entfernenden Substanzen in der Dialyseflüssigkeit sehr klein halten und dadurch die Geschwindigkeit des Dialyseprozesses erhöhen sowie das notwendige Volumen der Dialyseflüssigkeit minimieren. Auch die Verwendung von gebundenen komplexbildenden Substanzen ist möglich, um beispielsweise Metallionen zu entfernen. Die Probenplatte kann dabei, z. B. über ständer- bzw. fußartige Trägerelemente, im Dialysegefäß gehalten werden oder sie wird über Schwimmelemente in der Dialyseflüssigkeit des Dialysegefäßes gelagert.

[0019] Zur weiteren Erhöhung der Effektivität der Dialyse ist es auch vorteilhaft (zumal manche Dialysen, z. B. von Mizellen ausbildende Detergenzien, somit überhaupt erst ermöglicht werden), wenn in einem solchen Dialysesystem nicht nur die Dialyseflüssigkeit, sondern auch die Probenplatte zur gleichmäßigen Durchmischung der in den Probengefäßen enthaltenen Flüssigkeiten, beispielsweise durch eine Schüttleinrichtung, bewegt wird.

[0020] Die Erfindung soll nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

[0021] Es zeigen:

[0022] Fig. 1 Am Boden eines Dialysegefäßes durch Füße gehaltene Probenplatte

[0023] Fig. 2 Vorrichtung mit schwimmender Halterung der Probenplatte auf der Oberfläche der Dialyseflüssigkeit

[0024] Fig. 3 Dialysegefäß mit Halterung der Probenplatte gemäß Fig. 1 sowie mit Zu- und Abfluss für die Dialyseflüssigkeit

[0025] Fig. 4 Dialysegefäß mit Probenplatte in einem Kreislaufsystems zum Entfernen störender Substanzen aus der Dialyseflüssigkeit

[0026] Fig. 5 Vorrichtung zur Dialyse, bei welcher die Probenplatte in einem Schüttler zur Bewegung derselben auf-

genommen ist

[0027] Fig. 6 schwimmende Halterung der Probenplatte (vgl. Fig. 2) mit konischen Probengefäßen

[0028] Fig. 7 Verfahrensablauf zur Übertragung des dialysierten Probengutes durch Zentrifugation aus der Probenplatte mit konischen Probengefäßen in eine Auffangplatte mit zylindrischen Probengefäßen

5 [0029] Fig. 8 Verfahrensablauf gemäß Fig. 7 mit einer Dichtung zwischen Probenplatte und Auffangplatte

[0030] Fig. 9 Abhängigkeit der Leitfähigkeit der Dialyseflüssigkeit von der Dialysezeit

[0031] In Fig. 1 ist ein Dialysegefäß 1 mit darin befindlicher Dialyseflüssigkeit 2 gezeigt, auf dessen Boden im Gefäßinneren eine Probenplatte 3 mittels Halterungen 4 gelagert ist. Die Probenplatte 3 besteht aus einem plattenförmigen Grundkörper mit in einem an sich bekannten und zur Liquidhandling-Technik für die Mikroplattentechnologie passfähigen Raster  $8 \times 12$  angeordneten zylindrischen Aussparungen 5 zur Aufnahme von Probengut 6 im Bereich von Mikrolitervolumina.

[0032] An der Unterseite der Probenplatte 3 befindet sich eine an diese beispielsweise angeklebte und für alle Probengefäße gemeinsame semipermeable Dialyssembran 7, über welche das in den Aussparungen 5 enthaltene Probengut 6 jeweils mit der Dialyseflüssigkeit 2 in Verbindung steht. Zu diesem Zweck ist die Probenplatte 3 durch die Halterungen 4 so gelagert, daß dieselbe mit der Dialyssembran 7 in die Dialyseflüssigkeit 2 eintaucht. Durch die Dialyssembran 7 ist der Austausch kleiner Moleküle, je nach Ausschlussgrenze möglich, indem ein Konzentrationsausgleich zwischen der Dialyseflüssigkeit 2 und den Flüssigkeiten des Probengutes 6 eintritt. Die Entfernung der besagten kleinen Moleküle aus dem Probengut 6 erfolgt somit durch die Gleichgewichtseinstellung zwischen den Konzentrationen der beiden Kompartimente. Große Moleküle werden durch die Dialyssembran 7 zurückgehalten.

20 [0033] Die Ebene der Dialyssembran 7 verkörpert quasi auch die unterste Ebene der Probenplatte 3 bei ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung. Es existieren in diesem Rasterbereich der Probengefäße (Aussparungen 5) keine Zonen oder Elemente zur Stabilisierung, Befestigung, Handhabung etc. oder auch herstellungsbedingte Bereiche, welche von der Probenplatte 3 ausgehend die Ebene der Dialyssembran 7 überragen, die Dialyseflüssigkeit 2 berühren oder in diese eintauchen sowie dort den gleichmäßig verlaufenden Dialyseprozess störende Luftbarrieren ausbilden oder fördern können.

25 [0034] Durch einen an sich bekannten Magnetrührer 8 am Boden des Dialysegefäßes 1 wird die Dialyseflüssigkeit 2 in Bewegung gehalten, um einen Konzentrationsgradienten an der Dialyssembran 7 möglichst klein zu halten und die Dialyse zu beschleunigen. Eine Klebefolie 9 als lösbarer Verschluss der oberen Enden der Probengefäße (Aussparungen 5) schützt das in diesen befindliche Probengut 6 und verhindert ein Verdunsten und eine Kontamination der kleinen Probenvolumina.

30 [0035] In Fig. 2 ist ein Aufbau ähnlich dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 1 gezeigt, mit dem Unterschied, daß die Probenplatte 3 nicht (wie in Fig. 1) über fuß- oder ständerartige Halteelemente 4 fest auf dem Boden des Dialysegefäßes 1 steht, sondern durch ein rahmenförmiges Schwimmelement 10 unmittelbar auf der Oberfläche der Dialyseflüssigkeit 2 gehalten wird, so daß die Dialyssembran 7 auf dieser Oberfläche aufliegt. Diese Halterung ist unabhängig vom Füllstand der Dialyseflüssigkeit 2 im Dialysegefäß 1. Zusätzlich besitzt die Probenplatte 3 Entlüftungslöcher 11, welche sich sammelnde Gase unterhalb der Probenplatte 3 entweichen lassen und somit einen vollständigen Kontakt der Dialyssembran 7 mit der Oberfläche der Dialyseflüssigkeit 2 gewährleisten. Dieser vollständige Kontakt bildet die Voraussetzung für eine simultane und essentiell gleichmäßig für alle Proben erfolgende Dialyse dieser großen Probenzahlen im  $\mu$ l-Volumenbereich. Dadurch, dass die Probenplatte 3 zumindest im Rasterbereich der Probengefäße (Aussparungen 5) keine Elemente (beispielsweise zur Halterung o. ä.) besitzt, die nach unten über die Ebene der Dialyssembran 7 hinausragen und in die Dialyseflüssigkeit 2 eintauchen oder dieselbe berühren können, werden schon wesentliche Verwendungseigenschaften für den bestimmungsgemäßen Einsatz der Probenplatte 3 in einem Dialysesystem geschaffen, um Luftbarrieren in der Berührungszone der Dialyseflüssigkeit 2 an der Probenplatte 3 zu vermeiden oder zumindest nicht zu unterstützen. Treten dennoch prozessbedingt Gase in dieser Berührungszone auf, so können diese, wie besagt, durch die Entlüftungslöcher 11 nach oben durch die Probenplatte 3 entweichen. Anstatt der Entlüftungslöcher 11 wären auch andere Elemente, wie Randanphasungen o. ä., denkbar. Aus Übersichtsgründen sind die Entlüftungslöcher 11 (oder andere Entlüftungselemente) nicht in jeder konstruktiven Figur der Zeichnung explizit dargestellt.

45 [0036] Fig. 3 zeigt eine Vorrichtung zur Dialyse, bei welcher die Probenplatte 3 (wie in Fig. 1) mittels der fuß- oder ständerartigen Halteelementen 4 auf dem Boden im Innern des Dialysegefäßes 1 gelagert ist. Das Dialysegefäß 1 besitzt hier einen Zulauf 12 sowie einen Ablauf 13 für die Dialyseflüssigkeit 2. Das Niveau (Füllstand) der Dialyseflüssigkeit 2 wird durch einen einstellbaren Schwimmer 14 mit einem Schwimmerventil 15 reguliert, wobei der Schwimmer 14 in einer Schwimmerführung 16 vertikal beweglich geführt wird. Der Vorteil besteht in der kontinuierlichen Austauschmöglichkeit der Dialyseflüssigkeit 2. Damit wird das Einstellen eines Konzentrationsgleichgewichts zwischen der Dialyseflüssigkeit 2 und dem in den Probengefäßen (Aussparungen 5) jeweils enthaltenen Probengut 6 vermieden, die Dialysegeschwindigkeit ist höher und die Entfernung niedermolekularer Substanzen aus dem Probengut 6 grundsätzlich verbessert.

50 [0037] Fig. 4 zeigt eine Vorrichtung zur Dialyse, bei der das in Draufsicht gezeigte Dialysegefäß 1 mit der darin aufgenommenen Probenplatte 3 (vgl. Fig. 1 und Fig. 3) sowie mit dem Zulauf 12 und dem Ablauf 13 als Bestandteil eines Kreislaufsystems für den Durchfluss der Dialyseflüssigkeit 2 dargestellt ist. Der Austausch der Dialyseflüssigkeit 2 erfolgt nicht, wie in der Vorrichtung gemäß Fig. 3, durch ein offenes System, sondern die Dialyseflüssigkeit 2 wird durch eine Pumpe 17 und eine Filterkartusche 18 in einer Leitung 19 als Kreislauf durch das Dialysegefäß 1 bewegt. Der Weg (Richtung) der Dialyseflüssigkeit 2 ist durch Pfeile angedeutet, wobei die schwarzen Pfeile die Auslassrichtung der Dialyseflüssigkeit 2 symbolisieren. Bei ihrem Auslaß aus dem Dialysegefäß 1 kann die Dialyseflüssigkeit 2 beispielsweise mit Ionen und/oder Detergenzien aus dem Probengut 6 angereichert sein. Durch ein (oder mehrere) Sorbentz(en) in der Filterkartusche 18 können diese Bestandteile dem Kreislauf entzogen werden. Die gereinigte Dialyseflüssigkeit 2 gelangt somit, wie durch die weißen Pfeile angedeutet, in das Dialysegefäß 1 zurück. Zweckmäßig ist hier die wiederholte Verwendbarkeit der Dialyselösung 2, verbunden mit der besagten Vermeidung des Einstellens eines Konzentrationsgleichgewichts zwischen der Dialyseflüssigkeit 2 und dem in den Probengefäßen (Aussparungen 5) jeweils enthaltenen Pro-

bengut 6 und den damit verbundenen Vorteilen für die Dialyse (siehe Ausführungsbeispiel zu Fig. 3).

[0038] Fig. 5 zeigt eine Vorrichtung zur Dialyse (wiederum in geschnittener Vorderansicht und Draufsicht), bei welcher die Probenplatte 3 weder fest auf dem Boden des Dialysegefäßes 1 (vgl. Fig. 1) noch schwimmend auf der Dialyseflüssigkeit 2 im Dialysegefäß 1 (vgl. Fig. 2) gelagert ist, sondern durch eine Halterung 20 aufgenommen ist, die über einen Schüttlerarm 21 mit einem Schüttler 22 in Verbindung steht. Schüttler 22 dient, angedeutet durch die weißen gekreuzten Pfeile in Fig. 5, zur Horizontalbewegung der Probenplatte 3 über die Oberfläche der Dialyseflüssigkeit und bewegt die Probenplatte 3 in einem Bereich der Amplitude und Frequenz von an sich bekannten im Laborbetrieb eingesetzten Schüttlern für Mikrotiterplatten. Dadurch wird das in den Probengefäßen (Aussparungen 5) der Probenplatte 3 befindliche Probengut 6 durchmischt, was einer Entstehung von Konzentrationsgradienten im Probengut 6, wie auch in der Dialyseflüssigkeit 2, auf die sich die Schüttelbewegung überträgt, entgegenwirkt. Außerdem wird die für manche Dialyseprozesse besonders hinderliche Ausbildung von sekundären Membranen vermieden.

[0039] Der Vorteil dieser Vorrichtung ist, daß ggf. auch kombiniert mit dem Wechsel der Dialyseflüssigkeit 2 bzw. deren Umwälzung und Reinigung, wie in den Ausführungsbeispielen zu Fig. 3 und Fig. 4 beschrieben, die Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Dialyse erhöht wird. Die kombinatorische Darstellung mit den besagten vorher beschriebenen Ausführungsbeispielen ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gesondert in der Zeichnung enthalten. In einer weiteren hier nicht gezeigten Ausführungsform kann die Mischung von Proben und Dialyseflüssigkeit mit den genannten positiven Effekten auch durch Einkopplung eines Ultraschallmischers erfolgen.

[0040] Fig. 6 zeigt (ebenfalls in geschnittener Vorderansicht und Draufsicht) eine Vorrichtung zur Dialyse, bei welcher die Probenplatte 3 (wie in Fig. 2) schwimmend auf der Oberfläche der Dialyseflüssigkeit 2 gelagert ist. Die Probenplatte besitzt nicht, wie bei den vorher beschriebenen Ausführungsbeispielen, Probengefäße mit zylindrisch parallelen Gefäßwänden, sondern konisch gestaltete Aussparungen 5a in Form eines Kegelstumpfes mit jeweils größeren unteren und durch die Dialysemembran 7 verschlossenen Öffnungen sowie vergleichsweise kleineren oberen Öffnungen. Diese kleineren oberen Öffnungen bilden einen vorteilhaften Formschluss (vgl. Fig. 7) zum Übertragen des Probengutes 6 nach der Dialyse in (im selben Raster befindliche) Einzelvolumina anderer Probenaufnahmeplatten, insbesondere der an sich bekannten Mikrotiterplattentechnologie. Gut erkennbar in der Draufsicht-Darstellung von Fig. 6 ist auch die Klebefolie 9 über der Rasteranordnung der Probengefäße (Aussparungen 5a), welche ein Verdunsten, Verschütten und Kontaminieren des in den Aussparungen 5a befindlichen Probengutes 6 während der Dialyse oder auch beim Transport verhindert.

[0041] Fig. 7 und Fig. 8 zeigen schematisch jeweils in Schnittdarstellung durch die Platte einen solchen Verfahrensablauf zur Übertragung des dialysierten Probengutes durch Zentrifugation aus der Probenplatte 3 mit konischen Probengefäßen (vgl. Fig. 6) in eine Auffangplatte 23 mit zylindrischen Probengefäßen. Die Auffangplatte 23 wird umgekehrt auf die Probenplatte 3 aufgesetzt und gemeinsam mit dieser gedreht. Durch Zentrifugation wird das zunächst in der Probenplatte 3 befindliche Probengut 6 in die Auffangplatte 23 übertragen. Anschließend werden die Probenplatte 3 und die Auffangplatte 23 wieder voneinander getrennt. Als Zentrifuge kann eine an sich bekannte Laborzentrifuge für Mikrotiterplatten eingesetzt werden. In Fig. 7 sind die oberen Öffnungen der Aussparungen 5 kleiner als die diesen zugewandten Öffnungen der Probengefäße von der Auffangplatte 23, wodurch der bereits beschriebene gute Formschluss durch das in der Zeichnung angedeutete ineinandergreifen der Probengefäße gewährleistet wird. Bei Fig. 8 hingegen sind die einander zugewandten Öffnungen der Probengefäße von der Probenplatte 3 und der Auffangplatte 23 jeweils gleichgroß. Hier wird ein erforderlicher dichter Formschluss durch eine zwischen der Probenplatte 3 und der Auffangplatte 23 angeordnete Dichtung 24 gewährleistet.

[0042] In den folgenden vier Anwendungsbeispielen wird gezeigt, wie mit den beschriebenen Vorrichtungen unterschiedliche Substanzen dialysiert wurden.

#### Anwendungsbeispiel 1

[0043] Es sollen mit einer Vorrichtung, welche die Aufnahme der Probenplatte 3 in einer Schüttleinrichtung gemäß Fig. 5 vorsieht und die nach Fig. 4 in ein Kreislaufsystem für die Dialyseflüssigkeit 2 eingebunden ist, gleichmäßig, simultan aus 96 Proben, niedermolekulare Substanzen, wie p-Nitrophenol (p-NP) und Kochsalz, in kurzen Dialysezeiten entfernt werden.

[0044] Dazu werden in die 8 × 12 Dialysegefäße, die mit einer VSWP Millipore Membran (0,025 µm) verschlossen sind, je 100 µl einer 1,5 mM p-NP Lösung in 50 mM Diäthanolaminpuffer pH = 9,8 (DEA), die zusätzlich 750 mM NaCl enthält, pipettiert und gegen ein nur 11-fach größeres Volumen von 110 ml deionisiertem Wasser 2 Stunden dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit 2 wird mit einer Schlauchpumpe umgepumpt. In den Kreislauf ist eine Deionisierungssäule (Eco Pac, 10 ml, Bio-Rad) integriert (vgl. Fig. 4). Während der Dialyse wird die Probenplatte 3, die mit der Klebefolie 9 verschlossen und in der Halterung 20 der Schüttleinrichtung befestigt ist (siehe Fig. 5), ständig geschüttelt. Die Effektivität der Abtrennung des niedermolekularen p-Nitrophenols nach der Dialyse wird durch Vergleich der Absorbanzen bei 405 nm der dialysierten Proben mit den Absorbanzen der Ausgangslösung geprüft. Zur Absorbanzmessung der zur Dialyse eingesetzten Ausgangslösung werden nach Verdünnung mit DEA-Pufferlösung pH = 9,8 in einer Mikrotiterplatte die Absorbanzen in einem Reader gemessen. Zur Absorbanzmessung der 96 dialysierten Proben werden mit einer Multipipette aus der Probenplatte 3 Aliquots entnommen, mit einer 50 mM DEA-Pufferlösung pH = 9,8 in einer Mikrotiterplatte gemischt und in einem Reader gemessen.

[0045] Der Vergleich der Absorbanzen in den 96 Positionen des Dialysemoduls ist in Tabelle 1 gezeigt. Die gemessenen Absorbanzen sind um den Pufferblindwert reduziert.



Tabelle 1

Vergleich der Absorbanzen bei 405 nm ( $A_{405}$ ) vor und nach Dialyse

Proben	$A_{405}$ Analyselösung Mittelwert (n=96)	Verdünnungs- faktor Analyselösung	$A_{405}$ Gesamt	p-NP (%)
p-NP vor Dialyse	$0,397 \pm 0,005$	30	11,910	100
p-NP nach Dialyse	$0,028 \pm 0,002$	3,75	0,105	0,88

[0046] Die Werte zeigen, daß unter den beschriebenen Bedingungen mehr als 99% des p-NP entfernt werden konnte. Die Streuung der Absorbanzwerte nach Dialyse zeigt, daß die Dialyseggeschwindigkeit in allen 96 Dialysegefäßen sehr ähnlich ist.

[0047] Neben dem Vergleich der Absorbanzen vor und nach der Dialyse, wurde zusätzlich die Leitfähigkeit der eingesetzten Proben (6) gemessen und mit der Leitfähigkeit der Proben nach der Dialyse aus den 96 Dialysegefäßen verglichen. Aus diesen Werten wurde eine Resleitfähigkeit gegenüber der Ausgangslösung von 0,2% bestimmt, was die Effektivität der Dialyse ebenfalls bestätigt.

## Anwendungsbeispiel 2

[0048] Zur Abtrennung niedermolekularer Ionen von Proteinen werden in  $8 \times 11$  Positionen der Probenplatte 3 je 75 µl einer konzentrierten Lösung von alkalischer Phosphatase (14,5 µg/ml) in 1 M DEA-Puffer pH = 9,8 gegeben und 1 Stunde gegen ein großes Volumen von 470 ml deionisiertes Wasser dialysiert. Die Probenplatte 3, die auf einem Polystyrolrahmen als Schwimmelement 10 aufgelegt ist, schwimmt auf der Dialyseflüssigkeit 2, welche von dem Magnetrührer 8 bewegt wird (vgl. Fig. 2). Die kontinuierliche Abnahme der niedermolekularen Substanzen in den Probengefäßen (Aussparungen 5) wird durch Messung der Leitfähigkeit (vgl. Fig. 9) in der Dialyseflüssigkeit 2 verfolgt. Nach 60 min Dialyse sind 96% der dialysierbaren Ionen entfernt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase in den 88 besetzten Dialysegefäßen der Probenplatte 3 und ein Vergleich der enzymatischen Aktivität mit der Ausgangslösung ergab eine Wiederfindung der Enzymaktivität von  $90,4 \pm 4,3\%$ .

## Anwendungsbeispiel 3

[0049] Am Beispiel von Triton X-100 (TX-100) soll geprüft werden, ob es möglich ist, dieses häufig genutzte Detergenz durch Dialyse aus Analyseproben zu entfernen. Dazu wird die Probenplatte 3 mit je 75 µl einer 0,5%igen wässrigen Triton X-100 Lösung beschickt und gegen Leitungswasser 8 Stunden dialysiert. Die Probenplatte 3 wird mit der Klebefolie 9 verschlossen, wiederum in die Halterung 20 der Schüttleinrichtung eingeführt (vgl. Fig. 5) und ständig geschüttelt. Dabei taucht dieselbe in 170 ml Leitungswasser als Dialyseflüssigkeit 2 ein, welches in einem Kreislaufsystem gemäß Fig. 4 mit einer Fließgeschwindigkeit von 170 ml/min erneuert wird.

[0050] Um eventuelle Volumenänderungen zu erfassen, wird die Probenplatte 3 vor und nach Dialyse gewogen. Zur Testung der Effektivität der Tritonentfernung durch Dialyse werden mit einer Multipipette Aliquots aus den Dialysegefäßen des Moduls entnommen, in einer Mikrotiterplatte mit 30%igem n-Propanol gemischt und in einem Fluoreszenzreader bei einer Excitationswellenlänge von 270 nm nach einer Emissionswellenlänge von 310 nm gemessen. Die zur Dialyse eingesetzte Triton X-100 Lösung wird nach Verdünnung in 30%igem n-Propanol unter gleichen Bedingungen in einer Mikrotiterplatte gemessen. Zur Korrektur der Messwerte und zur Kontrolle der Linearität des Messbereichs werden sowohl die Propanollösung in 56 Positionen der Mikrotiterplatte (Blindwerte) als auch drei Eichkonzentrationen von Triton X-100 zwischen 12,5 und 50 µM unter gleichen Bedingungen gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die gemessenen Mittelwerte sind um den gemittelten Propanolblindwert reduziert.

Tabelle 2

Vergleich der Fluoreszenzen vor und nach Dialyse

Proben	Fluoreszenz Analyselösung Mittelwert (n=96)	Verdünnungs- faktor Analyselösung	Fluoreszenz Gesamt	TX-100 (%)
TX-100 vor Dialyse	$739,6 \pm 11,83$	201	148 660	100
TX-100 nach Dialyse	$62,39 \pm 6,24$	30	1 872	1,26

[0051] Die gemessenen Fluoreszenzen nach Dialyse in den 96 Dialysegefäßen der Probenplatte 3 zeigen, daß unter den beschriebenen Bedingungen 98,7% des Triton X-100 gleichmäßig aus allen 96 Dialysegefäßen entfernt werden kann.

#### Anwendungsbeispiel 4

[0052] Die Probenplatte 3 kann auch zum gleichzeitigen Konzentrieren von 96 Proben verwendet werden. Dazu werden je 100 µl einer 0,3%igen Dextranblaulösung mit einer Multipipette in die Probengefäße (Ausparungen 5) der Probenplatte 3 pipettiert. Die Probenplatte 3 wird anschließend auf den Schwimmrahmen 10 (vgl. Fig. 2) aus Polystyrol fixiert, welcher auf 100 ml einer 30%-igen wässrigen Polyethylenglykollösung (PEG 40 000) gelegt. Nach 45 min wurde die Volumenreduktion quantitativ bestimmt. Dazu wurden aus 88 von 96 Positionen je 30 µl mit einer Multipipette entnommen und in eine Mikrotiterplatte pipettiert, die je 120 µl 50 mM DEA-Pufferlösung enthält. In die fehlenden 8 Positionen der Mikrotiterplatte wurden statt der Probelösung je 30 µl Referenzlösung (0,3% Dextranblaulösung) gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde nach intensivem Mischen bei 620 nm in einem Reader gemessen. Ein Vergleich der gemittelten Absorbanzen von Proben und Referenzlösung zeigt die unter den beschriebenen Bedingungen gemessenen Absorbanzen (Tabelle 3).

Tabelle 3

Vergleich der Absorbanzen von Dextranblau vor und nach Konzentrierung

Proben	A <sub>620</sub>
Referenzlösung	0,291 ± 0,012 (n=8)
Proben nach Konzentrierung	0,465 ± 0,020 (n=88)

[0053] Die Absorbanzen haben um den Faktor 1,6 zugenommen. Das bedeutet, daß nach 45 min das Volumen der Proben um 37,5 µl abgenommen hat, und zwar relativ gleichmäßig, wie die Streuung zeigt.

#### Aufstellung der verwendeten Bezugszeichen

1 Dialysegefäß	
2 Dialyseflüssigkeit	
3 Probenplatte	30
4 Halterung	
5, 5a Ausparung	
6 Probengut	
7 Dialysemembran	
8 Magnetrührer	35
9 Klebefolie	
10 Schwimmelement	
11 Entlüftungsloch	
12 Zulauf	
13 Ablauf	40
14 Schwimmer	
15 Schwimmerventil	
16 Schwimmerführung	
17 Pumpe	
18 Filterkartusche	45
19 Leitung	
20 Halterung	
21 Schüttlerarm	
22 Schüttler	
23 Auffangplatte	50
24 Dichtung	

#### Patentansprüche

1. Probenplatte zur Verwendung in Dialysesystemen mit Probengefäßen, welche jeweils mittels semipermeabler Membran von einer in einem Dialysegefäß befindlichen Dialyseflüssigkeit getrennt sind, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probenplatte (3) eine im an sich bekannten sowie zur Liquidhandlingtechnik für die Mikroplattentechnologie passenden Raster (n × 8 × 12) angeordnete Vielzahl gleicher Probengefäße (5) enthält, deren obere Enden offen und deren untere Enden durch in einer Ebene liegende Dialysemembranen (7) verschlossen sind, dass die Probenplatte (3) im Rasterbereich der Probengefäße (5) keine die Ebene der Dialysemembranen (7) überragende und beim bestimmungsgemäßen Einsatz in der Dialyseflüssigkeit (2) Gasbarrieren bildende oder unterstützende Bereiche oder Elemente aufweist und dass in den Randbereichen der Probenplatte (3) Elemente, beispielsweise Öffnungen (11), zum Entweichen von Luft nach Eintauchen in die Dialyseflüssigkeit (2) vorgesehen sind.
2. Probenplatte gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass diese aus einer Platte (3) mit zylindrischen Ausparungen (5) als Probengefäße besteht.
3. Probenplatte gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probengefäße (5) im Fassungsvermögen für Mikrolitervolumina ausgeführt sind.
4. Probenplatte gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass diese die äußeren Abmessungen von an sich be-

kantigen Mikrotiterplatten hat.

5. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die unteren Enden der Probengefäße jeweils durch einzelne Dialysemembranen (7) geschlossen sind.
6. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die unteren Enden der Probengefäße durch eine oder mehrere gemeinsame Dialysemembranen (7) geschlossen sind.
7. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dialysemembranen (7) aus mehreren Membranschichten bestehen.
8. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenplatte (3) auf die Dialysemembranen (7) aufgespritzt ist.
9. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dialysemembran (7) auf die Unterseite der Probenplatte (3) geklebt ist.
10. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dialysemembran (7) auf die Unterseite der Probenplatte (3) gebondet, geschweißt oder gespritzt ist.
11. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Klebefolie (9) als lösbarer Verschluss der oberen Enden der Probengefäße (5) vorgesehen ist.
12. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Deckel als lösbarer Verschluss der oberen Enden der Probengefäße (5) vorgesehen ist.
13. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich diese zur Dialyse in einem Dialysegefäß (1) befindet, welches mindestens einen Zufluss (12) sowie mindestens einen vorzugsweise mit einem Schwimmerventil (15) in Verbindung stehenden Abfluss (13) für die Dialyseflüssigkeit (2) aufweist.
14. Probenplatte gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem mindestens einen Abfluss (13) und dem mindestens einem Zufluss (12) Mittel (18) zur Entfernung von zu dialysierenden Substanzen aus der Dialyseflüssigkeit (2) vorgesehen sind.
15. Probenplatte gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass diese Mittel aus wenigstens einem Ionenaustauscher bestehen.
16. Probenplatte gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass diese Mittel als Detergenzien bindende Adsorber ausgebildet sind.
17. Probenplatte gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass diese Mittel chelatbildende Substanzen enthalten.
18. Probenplatte gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Durchflußmenge der Dialyseflüssigkeit (2) durch den mindestens einen Zufluss (12) und durch den mindestens einen Abfluss (13), beispielsweise durch Ventile oder Stillelemente, jeweils einstellbar ist.
19. Probenplatte gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Dialysegefäß (1) mit seinem mindestens einen Zufluss (12) und mit seinem mindestens einen Abfluss (13) Bestandteil eines durch eine Umwälzpumpe (17) bewegten Kreislaufsystems für die Dialyseflüssigkeit (2) ist.
20. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass diese im Dialysegefäß (1), beispielsweise durch auf dem Gefäßboden aufliegende fuß- bzw. ständerartige Elemente (4), gehalten wird.
21. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass diese mittels eines oder mehrerer Schwimmer-elementen (10) in der Dialyseflüssigkeit (2) des Dialysegefäßes (1) gehalten wird.
22. Probenplatte gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass diese mit Mitteln (22, 21) zur Bewegung und Durchmischung zumindest der in den Probengefäßen (5) enthaltenen Flüssigkeit (6) in Verbindung steht.
23. Probenplatte gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass diese Mittel aus einem an sich bekannten Schüttler (22) bestehen.
24. Probenplatte gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass diese Mittel aus einer Ultraschallquelle bestehen.
25. Probenplatte nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich diese in einem Dialysesystem befindet, welches Kontrollelemente in der Dialyseflüssigkeit (2) besitzt.
26. Probenplatte nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass diese Kontrollelemente Mittel zur simultanen Leitfähigkeitsmessung sind.
27. Probenplatte nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass diese Kontrollelemente Mittel zur simultanen Messung der optischen Dichte sind.
28. Probenplatte nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass diese Kontrollelemente Fluoreszenzdetektoren sind.
29. Probenplatte nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass diese Kontrollelemente Thermometer sind.
30. Probenplatte nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Kontrollelemente zur Steuerung des Dialyseprozesses eingesetzt werden.
31. Probenplatte nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass zum Zweck einer Probenumfüllung, beispielsweise durch Zentrifugation, eine umgekehrt auf die Probenplatte (3) aufsetzbare Auffangplatte (23) mit einer Pluralität von Probengefäßen vorgesehen ist, deren Rasteranordnung ( $n \times 8 \times 12$ ) deckungsgleich zum Raster der Probengefäße (5) der Probenplatte (3) ist.
32. Probenplatte nach Anspruch 31 dadurch gekennzeichnet, dass die Probengefäßöffnungen der beim Aufsetzen der Auffangplatte (23) korrespondierenden Probengefäße der Auffangplatte (23) und der Probenplatte (3) jeweils unterschiedlich sind und für einen Formschluss vorzugsweise jeweils ineinander greifen.
33. Probenplatte nach Anspruch 32 dadurch gekennzeichnet, dass die Probengefäße (5) der Probenplatte (3) konisch ausgeführt sind, wobei die unteren größeren Öffnungen durch die Dialysemembranen (7) verschlossen sind und die oberen Öffnungen der Probengefäße (5) jeweils kleiner als die beim Aufsetzen der Auffangplatte (23) korrespondierenden Probengefäßöffnungen der Auffangplatte (23) sind.
34. Probenplatte nach Anspruch 31 dadurch gekennzeichnet, dass die Öffnungen der beim Aufsetzen der Auffang-

platte (23) korrespondierenden Probengefäße der Auffangplatte (23) und der Probenplatte (3) jeweils gleichgroß sind.

35. Probenplatte nach Anspruch 31 dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zum besseren Formschluss sowie zur Abdichtung zwischen der Probenplatte (3) und der Auffangplatte (23), beispielsweise eine Dichtung oder Paste, vorgesehen sind.

5

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

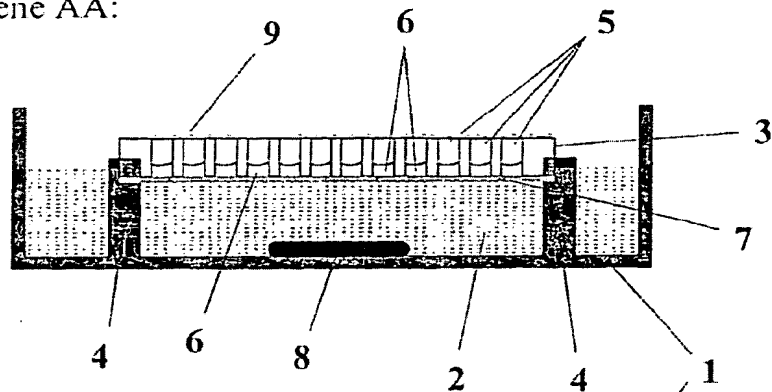
50

55

60

65

a) Schnittebene AA:



b) Draufsicht:

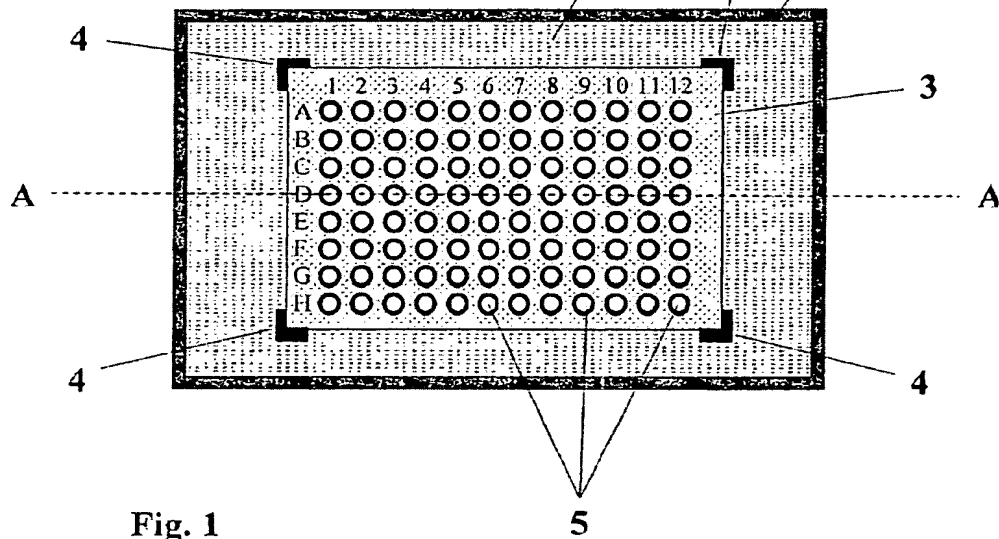
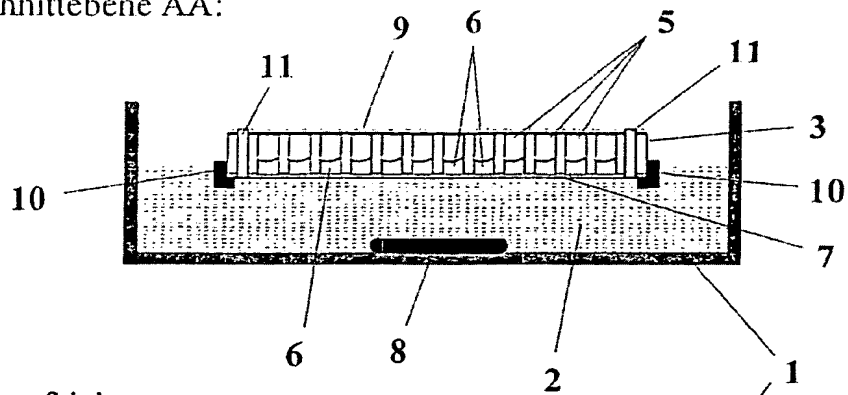


Fig. 1

a) Schnittebene AA:



b) Draufsicht:

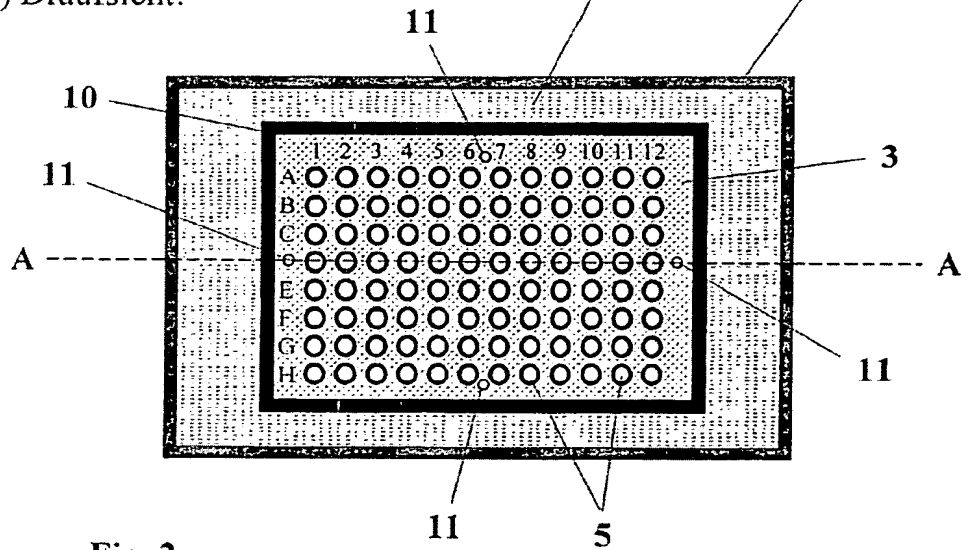
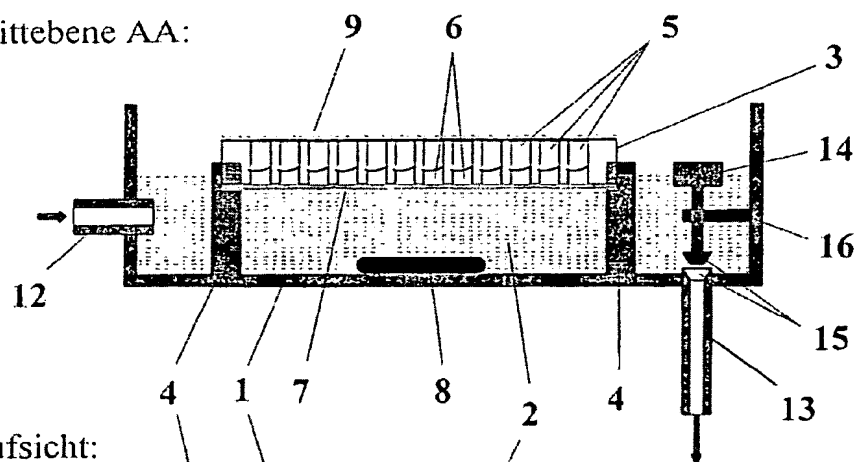
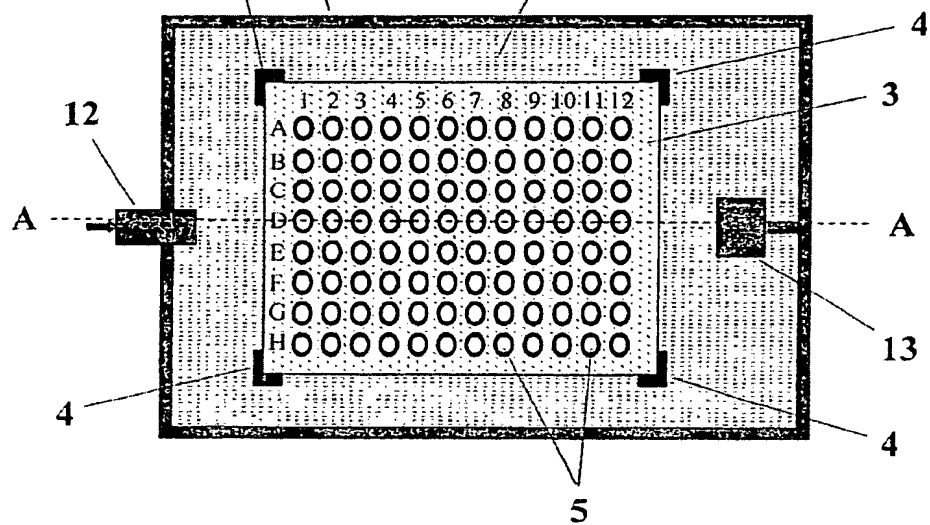


Fig. 2

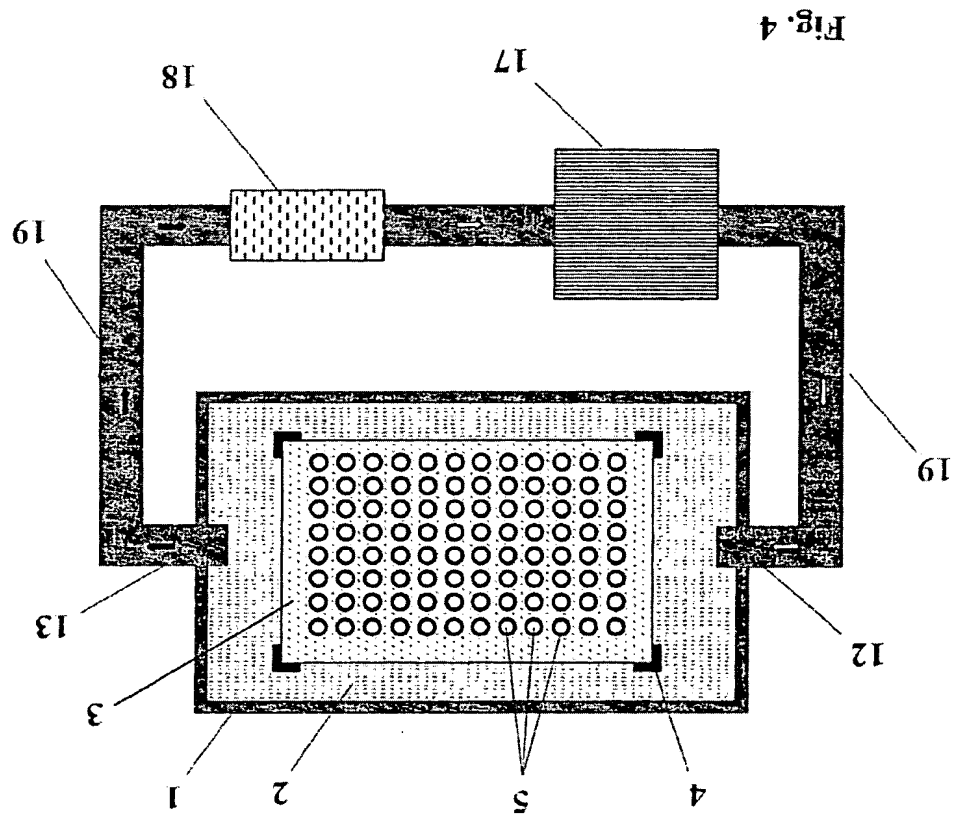
a) Schnittebene AA:



b) Draufsicht:

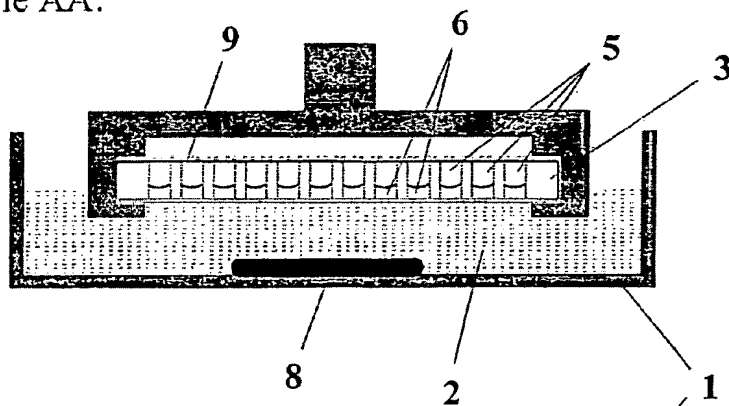


**Fig. 3**





a) Schnittebene AA:



b) Draufsicht:

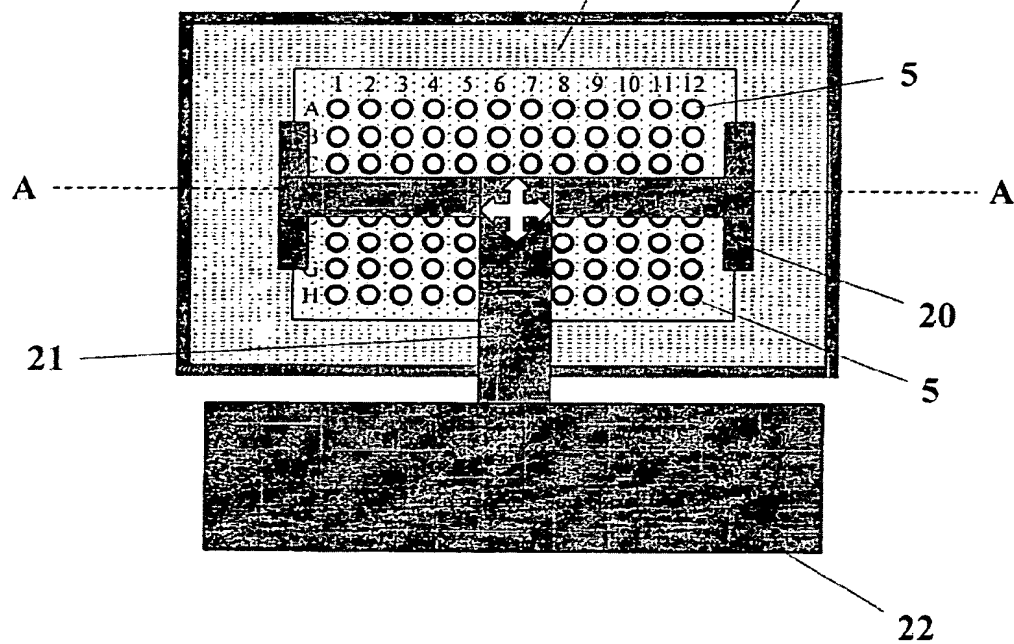
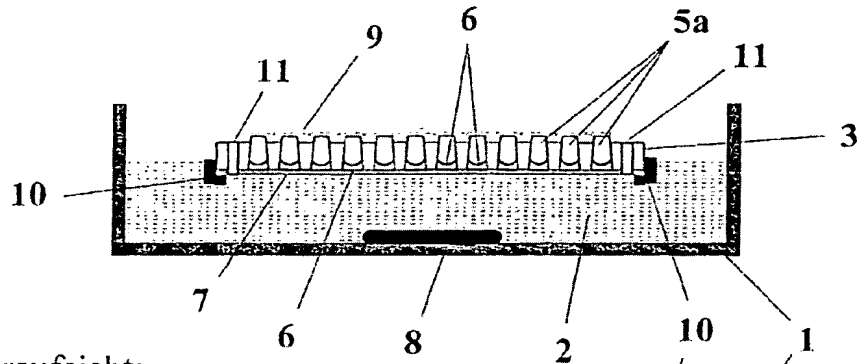


Fig. 5

a) Schnittebene AA:



b) Draufsicht:

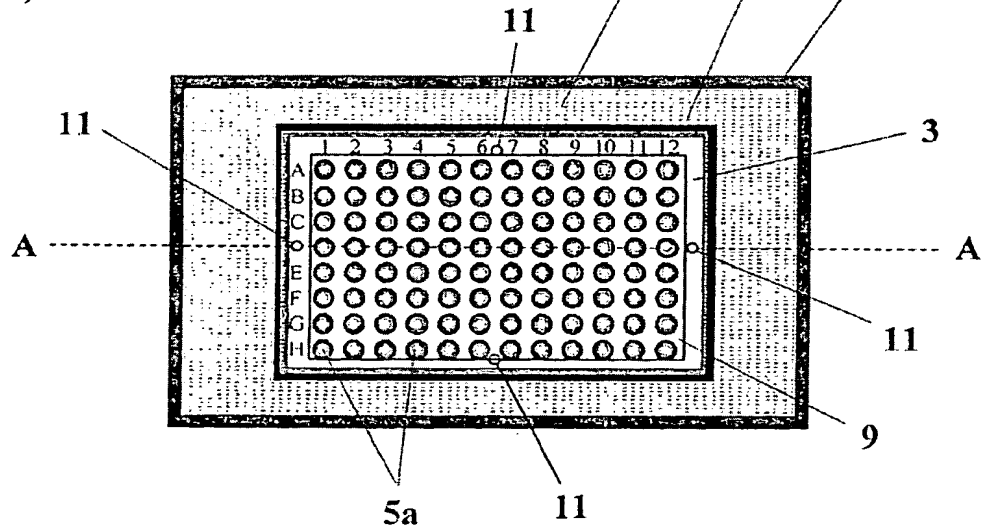
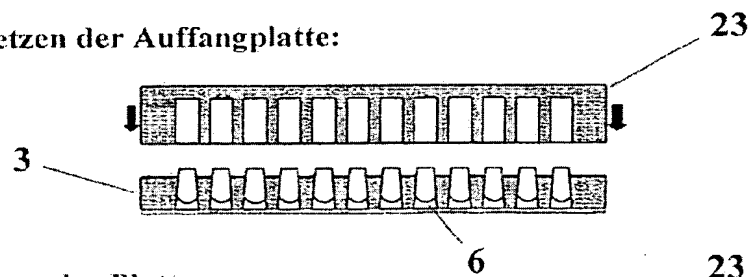
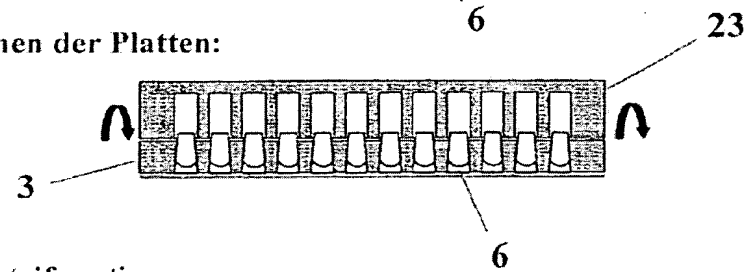


Fig. 6

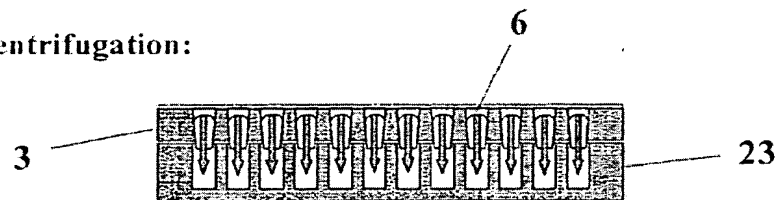
## I.) Aufsetzen der Auffangplatte:



## II.) Drehen der Platten:



## III.) Zentrifugation:



## VI.) Abnahme der Dialyseplatte:

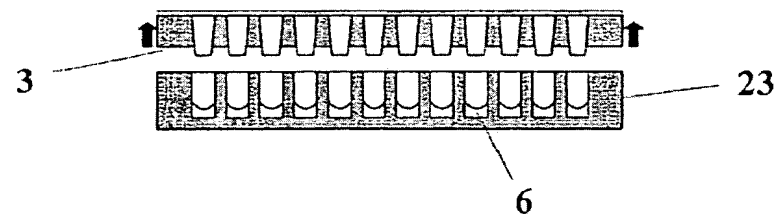
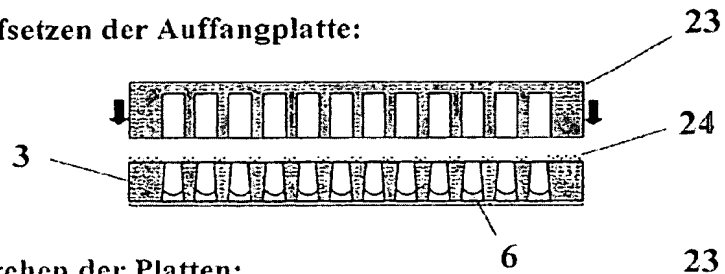
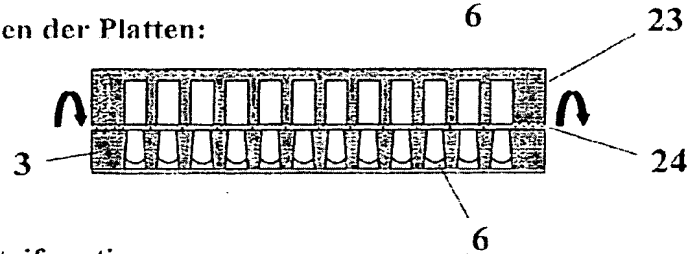


Fig. 7

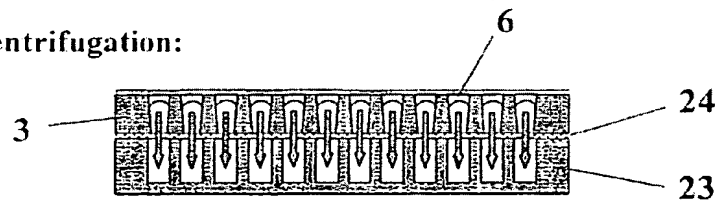
**I.) Aufsetzen der Auffangplatte:**



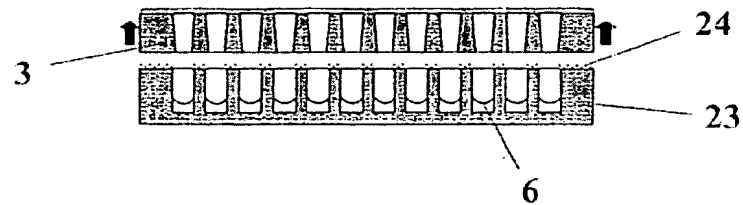
**II.) Drehen der Platten:**



**III.) Zentrifugation:**



**VI.) Abnahme der Dialyseplatte:**



**Fig. 8**

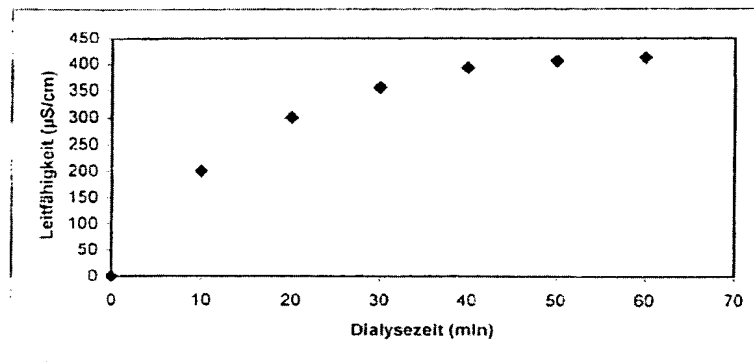


Fig. 9